

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE MADRID**

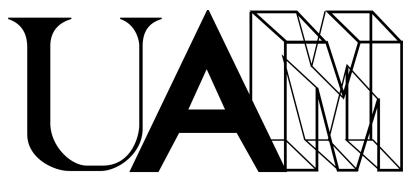
TESIS DOCTORAL

**TERAPIA CELULAR Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN
ROTURAS DE MANGUITO ROTADOR DE MODELO ANIMAL
MURINO**

Pablo Vadillo Cardona

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MEDICINA



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE MADRID

TESIS DOCTORAL

**TERAPIA CELULAR Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN
ROTURAS DE MANGUITO ROTADOR DE MODELO ANIMAL
MURINO**

Autor: Pablo Vadillo Cardona

Centro: Facultad de Medicina

Departamento: Cirugía

Directores: Dr. D. Raúl Barco Laakso

Dr. D. Samuel Antuña Antuña

Tutor: Prof. Dr. D. Emilio Calvo Crespo

A Teresa y a Marcos, por cambiarlo todo.

A mis padres, por su ejemplo y dedicación.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Prof. Dr. Samuel Antuña y el Dr. Raúl Barco. Por ser un referente académico y profesional a seguir. Gracias por abrirme la puerta al mundo de la investigación. Sin vuestra ayuda esta tesis no habría sido posible.

Al Servicio de Traumatología del Hospital la Paz. A mis maestros, por compartir conmigo su experiencia y conocimiento. A mis compañeros de residencia, por todas las horas pasadas de trabajo y amistad.

A mi tutor, el Prof. Dr. Emilio Calvo, por la confianza depositada en mí y por darme la oportunidad de desarrollarme como profesional.

A mis compañeros del Servicio de Traumatología del Hospital Infanta Elena, por hacer de todas las horas vividas allí algo bueno. Y en especial al Dr. Alberto Francés, por su empeño y dedicación con los que nos hace mejorar a todos.

Gracias a todos.

ABREVIATURAS

ARS: tinción de Rojo de Alizarina S

ASMA: alfa actina específica de músculo liso

bFGF: factor básico de crecimiento fibroblástico

BM-MSC: célula madre mesenquimal derivada de médula ósea.

SVF: porción estromal vascular sedimentada

BMP: proteína morfogenética

CMDL: células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo

CTGG: factor de crecimiento del tejido conectivo

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EFG: factor de crecimiento epidermoide

EICH: enfermedad injerto contra huésped

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

FBS: suero fetal bovino

H/E: hematoxilina eosina

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

IC: intervalo de confianza

IFATS: federación internacional de ciencia y terapia con tejido adiposo

IGF-1: factor de crecimiento insulínico

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

K-S: Kolmogórov-Smirnov

L-PRF: gel o fibrina rica en leucocitos y plaquetas

LAC: lipotransferencia asistida por células

MMP: metaloproteasa

MSC: célula madre mesenquimal

NP: no procede

ODN: oligodeoxinucleótidos antisentido

P-PRF: gel o fibrina rica en plaquetas

PBS: tampón salino fosfato

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMN: polimorfonucleares

PPGF: plasma pobre en factores de crecimiento

PPP: plasma pobre en plaquetas

PRGF: plasma rico en factores de crecimiento

PRP: plasma rico en plaquetas

RMN: resonancia magnética nuclear

SVF: fracción vásculo-estromal

TA: tomografía axial computerizada

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TIMP: inhibidor tisular de las metaloproteasas

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de roturas de manguito y manguitos íntegros globalmente y según la edad

Tabla 2. Tabla que compara la frecuencia de cicatrización de los hombros reparados quirúrgicamente y la técnica de imagen empleada para su evaluación

Tabla 3. Tabla que compara los resultados de la cicatrización (C) o rerrotura (RR) del manguito tras la reparación quirúrgica.

Tabla 4. Escala modificada de Watkins.

Tabla 5. Resultados del estudio biomecánico.

Tabla 6. Análisis estadístico de los resultados biomecánicos.

Tabla 7. Análisis en función del tiempo del estudio biomecánico para el grupo de tratamiento con PRP

Tabla 8. Resultados del análisis en función del tiempo del estudio biomecánico para el grupo de tratamiento con PRP y CMDL.

Tabla 9. Análisis estadístico en función del tratamiento en los distintos tiempos de sacrificio.

Tabla 10. Resultados del análisis de tendencia temporal del estudio histológico. (*, resultado estadísticamente significativo)

Tabla 11. Resultados de la escala de Watkins.

LISTADO DE IMÁGENES

Imagen 1. Ilustración anatómica de la región del hombro.

Imagen 2. Imagen correspondiente al manguito rotador tras su desinserción del húmero.

Imagen 3. Visión lateral de los componentes escapulares de la articulación glenohumeral. El acromion, el ligamento coracoacromial y la apófisis coracoides forman el arco coracoacromial.

Imagen 4. A. Modelo que muestra la huella anatómica del supraespinoso e infraespinoso. La huella anatómica del subescapular es anterior al surco bicipital. B. Visión lateral del húmero con las inserciones del manguito íntegras marcadas.

Imagen 5. Ilustraciones de la parte superior de un húmero derecho que muestran la inserción del supraespinoso e infraespinoso. A. Ilustración que representa el modelo más aceptado. B. Ilustración que muestra los hallazgos de Mochizuki.

Imagen 6. Esquema de las 5 capas del complejo manguito rotador-cápsula y su equivalente histológico.

Imagen 7. La imagen de la izquierda muestra como se mide el índice acromial. La imagen de la derecha muestra el método de medición del ángulo crítico del hombro.

Imagen 8. Imagen superior: clasificación de Harbermayer de las roturas parciales del supraespinoso en el plano coronal, basada en la extensión longitudinal de las roturas articulares del tendón del supraespinoso en un plano coronal. Imagen inferior: clasificación de Harbermayer de las roturas parciales del supraespinoso en el plano sagital, basada en la extensión de las roturas articulares del tendón del supraespinoso en un plano axial.

Imagen 9. Esquema de los diferentes tipos de rotura del manguito rotador en la clasificación geométrica.

Imagen 10. Clasificación de Warner de la atrofia del manguito rotador.

Imagen 11. Clasificación de Patte de las roturas del manguito rotador.

Imagen 12. Ilustración que muestra la estructura del tendón.

Imagen 13. Ejemplo de curva de tensión-deformación de nuestro estudio.

Imagen 14. Ilustración de las 3 fases de la reparación de la entesis.

Imagen 15. Muestra de tubo de sangre centrifugada.

Imagen 16. Esquema que describe el protocolo de Anitua para la obtención de PRP.

Imagen 17. Ilustraciones que muestran de forma esquemática la matriz y arquitectura celular de las 4 tipos de preparados de concentrados plaquetarios.

Imagen 18. Prensa electromecánica de la marca SERVOSIS® empleada en nuestro trabajo.

Imagen 19. Esquema que representa la distribución en los distintos grupos de los animales de experimentación.

Imagen 20. CMDL en distintas fases del confluencia.

Imagen 21. Esquema del procesado celular.

Imagen 22. La imagen de la izquierda muestra el implante del coágulo de PRP y proceso de anudado. La imagen de la derecha muestra la sutura de la piel con cabos cortos.

Imagen 23. Imágenes que muestran la inclusión de las muestras en una jeringa con cemento y su posterior colocación en la prensa electromecánica.

Imagen 24. Representación en forma de diagrama de barras de los resultados del análisis biomecánico.

Imagen 25. Diagrama de barras que representa los hallazgos histológicos a las 72 horas del tratamiento.

Imagen 26. Diagrama de barras que representa los hallazgos histológicos a la semana del tratamiento.

Imagen 27. Diagrama de barras que representa los hallazgos histológicos a las 2 semanas del tratamiento.

Imagen 28. Diagrama de barras que representa los hallazgos histológicos a las 4 semanas del tratamiento.

Imagen 29. Representación en forma de líneas de la evolución temporal de los 2 grupos de tratamiento.

Imagen 30. Las imágenes A y B muestran una visión craneal de hombro de rata (A) y humano (B). Las imágenes C y D muestran una visión lateral sobre la glena de rata (C) y humano (D).

Imagen 31. Esquema que muestra las distintas terapias biológicas y sus combinaciones.

ÍNDICE

I. Estado actual del tema	21
1) Importancia y magnitud del tema	21
2) El manguito rotador	22
a) Anatomía del manguito rotador	22
b) El arco subacromial	26
c) La huella anatómica	27
d) Histología del manguito rotador	29
e) Función y biomecánica del manguito rotador	31
f) Roturas del manguito rotador	32
i) Epidemiología de las roturas del manguito rotador	32
ii) Fisiopatología de las roturas del manguito rotador	34
iii) Clasificaciones de las roturas del manguito rotador	39
iv) Reparación de las roturas de espesor completo del manguito rotador	44
v) Resultados de la reparación del manguito rotador	46
3) La entesis	51
a) Estructura y composición tendinosa	51
b) Estructura de la entesis	53
c) Biomecánica tendinosa	54
d) Biología de la reparación de la entesis	56
4) Terapias biológicas para la reparación del manguito rotador	60
a) Factores de crecimiento	60
b) Inhibidores de las metaloproteasas	63
c) Terapia génica	64
d) Matrices extracelulares	65
e) Componentes celulares	65
f) Plasma rico en plaquetas	66
i) Definición de plasma rico en plaquetas	66
ii) Preparaciones de plasma rico en plaquetas	66
iii) Aplicación clínica del plasma rico en plaquetas	73
iv) Plasma rico en plaquetas y manguito rotador	74
g) Terapia celular	76
i) Definición de célula troncal	76
ii) Definición de terapia celular	77
iii) Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo	80
iv) Aplicación clínica de la terapia celular	82
v) Terapia celular y manguito rotador	85
II. Hipótesis y Objetivos del Trabajo	89
III. Material y Método	91

1) Diseño del estudio	91
2) Población del estudio.....	91
a) Criterios de inclusión.....	91
b) Criterios de exclusión	91
3) Variables del estudio.....	91
a) Independientes.....	91
b) Dependientes	91
i) Biomecánicas	91
ii) Histológicas	92
4) Material para medir las variables.....	96
a) Animal de experimentación.....	96
b) Material del procedimiento	97
c) Máquina de ensayos.....	98
5) Método de medida de las variables.....	99
a) Grupos de estudio	99
b) Obtención y expansión de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.....	100
c) Caracterización de MSC	103
d) Obtención de PRP.....	105
e) Preparación PRP y células para implantación	106
f) Procedimiento quirúrgico	106
g) Sacrificio y preparación de las muestras	108
h) Preparación de las muestras para el estudio histológico	109
i) Preparación de las muestras para el estudio biomecánico.....	112
6) Método estadístico.....	113
IV. Resultados.....	115
1) Complicaciones.....	115
2) Estudio biomecánico	115
a) Estadística descriptiva	115
b) Estadística inferencial.....	118
i) Análisis en función del tratamiento	118
ii) Análisis en función del tiempo	120
3) Estudio histológico.....	123
a) Análisis macroscópico.....	123
b) Estadística descriptiva	123
i) Muestras a las 72 horas de la cirugía	123
ii) Muestras a la semana de la cirugía.....	124
iii) Muestras a las 2 semanas de la cirugía.....	125
iv) Muestras a las 4 semanas de la cirugía.....	126

c) Estadística inferencial	128
i) Análisis en función del tratamiento	128
ii) Análisis de tendencia temporal.....	131
iii) Escala modificada de Watkins.....	133
V. Discusión	135
1) El animal de experimentación.....	136
2) El modelo experimental.....	139
3) Bioseguridad del PRP y CMDL	145
4) Interpretación de los resultados.....	148
5) Comparación de los resultados con los trabajos publicados.....	152
VI. Conclusiones	157
VII. Resumen.....	159
VIII. Bibliografía.....	165

1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1) Importancia y magnitud del tema

La patología del manguito rotador es una de las causas más frecuentes de dolor de hombro en adultos. Estudios epidemiológicos muestran que la prevalencia de roturas del manguito aumenta con la edad, oscilando entre un 30% y un 50% en el segmento de población mayor de 50 años¹.

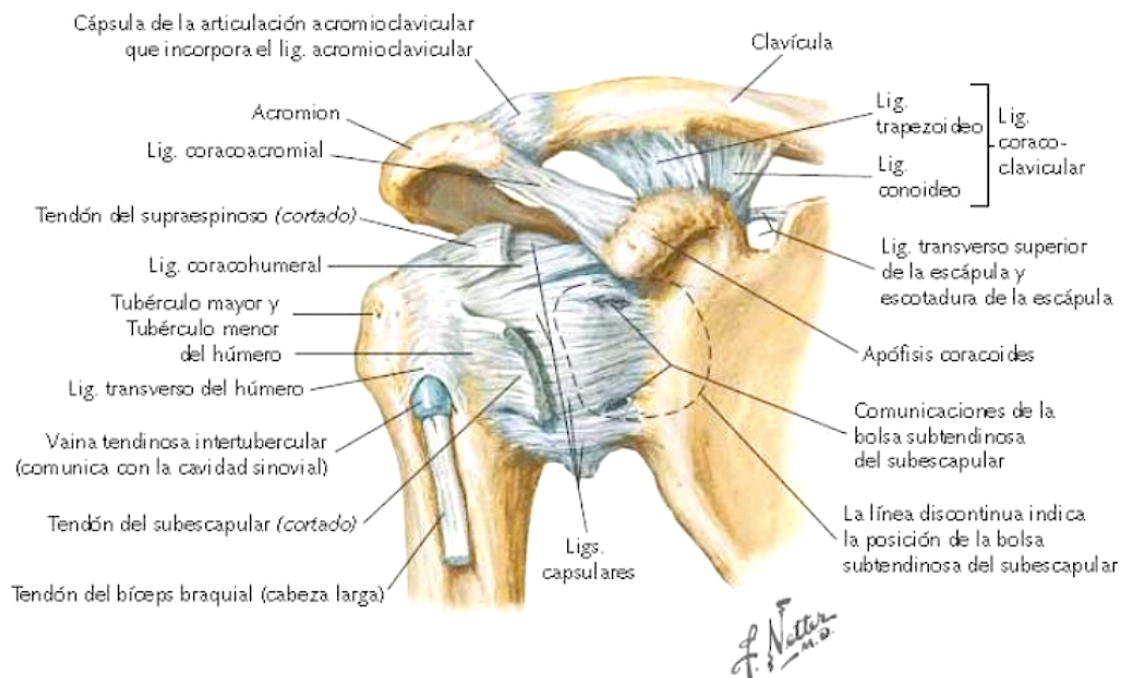
El tratamiento quirúrgico de las roturas de manguito ha evolucionado desde la reparación abierta hasta la sutura artroscópica de hilera simple, doble o transósea, con resultados clínicos similares^{2,3}. A pesar de estos avances en las técnicas de reparación quirúrgica, el índice de rerrotura sigue siendo muy elevado, llegando incluso al 94% en roturas masivas de manguito^{4,5}. Aunque existe controversia sobre si la integridad de la reparación se correlaciona con una mejor función postoperatoria, numerosos artículos relacionan la integridad de la reparación con mayor fuerza y movilidad^{6,7}.

El elevado índice de fracasos de la reparación quirúrgica del tendón, a pesar de las mejoras en la técnica, ha motivado la búsqueda de nuevos tratamientos basados en el estímulo biológico de la cicatrización. Tras la reparación quirúrgica la cicatrización no reproduce las 4 capas organizadas en la zona de inserción del tejido, denominada entesis, sino que en su lugar se forma una cicatriz fibrovascular entre el tendón y el hueso⁸. En la actualidad existe un interés creciente por el desarrollo de nuevos tratamientos que mejoren la cicatrización de la entesis.

2) El manguito rotador

a) Anatomía del manguito rotador

La articulación glenohumeral está formada por la cavidad glenoidea y la cabeza humeral. Es una articulación con un gran recorrido articular y con poca congruencia anatómica por lo que necesita del resto de estructuras tendinosas y ligamentosas para aumentar su estabilidad⁹. El manguito rotador controla los movimientos de abducción, elevación, rotación interna y externa, constituyendo uno de los principales estabilizadores dinámicos junto con la porción larga del bíceps, la articulación escapulotorácica y el resto de la musculatura periescapular¹⁰.



*Imagen 1. Ilustración anatómica de la región del hombro.
(Frank H. Netter. Atlas de anatomía humana. 6ª edición 2014).*

El manguito rotador está formado por cuatro músculos: subescapular, supraespinoso, infraespinoso y redondo menor. Aunque estos músculos están separados superficialmente, en sus regiones más profundas tienen una relación muy cercana unos con otros, con la cápsula articular y con el tendón de la porción larga del bíceps. En un estudio en cadáver¹¹ se observó como los tendones se fusionan cerca de su inserción, formando una estructura tendinosa única con un grosor medio de 9 a 12 mm. Los tendones del supraespinoso y del infraespinoso se unen a 15 mm de su inserción en el troquíter, no siendo posible su separación roma. Lo mismo ocurre entre el infraespinoso y el redondo menor. La zona de separación que existe entre el supraespinoso y el subescapular se denomina intervalo rotador. El intervalo rotador es una zona compleja de tejido, formado por: el ligamento coracohumeral, el ligamento glenohumeral superior y el tendón de la porción larga del bíceps, el cual atraviesa la cápsula glenohumeral a través de este intervalo para hacerse intraarticular.

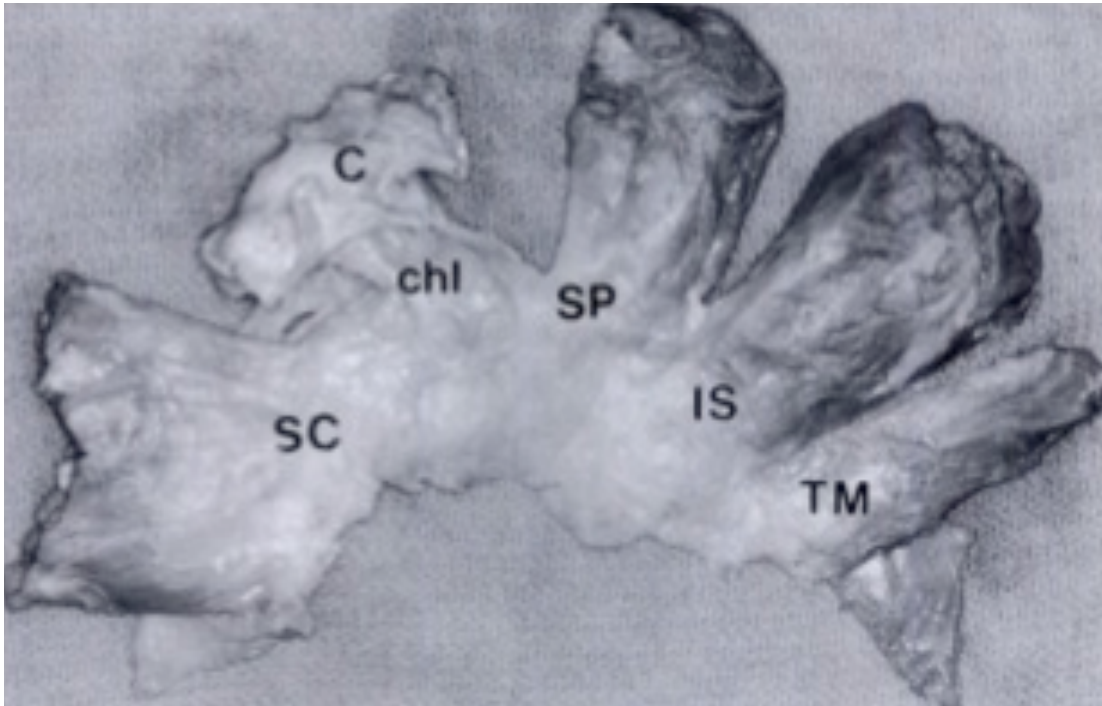


Imagen 2. Imagen correspondiente al manguito rotador tras su desinserción del húmero. SC: subescapular, chl: ligamento coracohumeral, C: fragmento osteotomizado de coracoides, B: bíceps, SP: supraespinoso; IS: infraespinoso; TM: redondo menor.

(Clark JM, Harryman DT 2nd. Tendons, ligaments, and capsule of the rotator cuff. Gross and microscopic anatomy. J Bone Joint Surg Am 1992 Jun;74(5):713-725).

El músculo supraespinoso se origina en la fosa supraespinosa y la parte superior de la espina y se inserta en el troquíter. Comparte su inserción tendinosa con el infraespinoso en la parte posterior y con el ligamento coracohumeral en la cara anterior. La inervación del supraespinoso proviene del nervio supraescapular (raíz C5 y parte de C6) y su irrigación arterial principal procede de la arteria supraescapular. Estas estructuras penetran en el músculo cerca de su punto medio en la escotadura supraescapular, ubicada medialmente a la base de la apófisis coracoides. La porción medial del músculo recibe vasos de la arteria escapular dorsal¹².

Su función es importante porque es activo en cualquier movimiento en el que se produce elevación del hombro, ejerciendo su esfuerzo máximo cerca de los 30

grados de elevación. El supraespinoso circunscribe la parte superior de la cabeza humeral y sus fibras se orientan directamente hacia la glenoides, por lo que también es importante para estabilizar la articulación glenohumeral produciendo un momento de compresión humeroglenoideo.

El infraespinoso es el segundo músculo más activo del manguito de los rotadores. Su origen se localiza en la fosa infraespinosa y la parte inferior de la escápula y su inserción se encuentra en el troquíter. Está limitado con el supraespinoso en su porción anterior y superior y con el redondo menor en la parte más inferior del troquíter. Está innervado por el nervio supraescapular (C5, C6) y su irrigación proviene de las arterias supraescapular y subescapular. Funciona como depresor de la cabeza humeral, siendo además uno de los principales rotadores externos del húmero, produciendo cerca del 60% de la fuerza de rotación externa.

El redondo menor se origina en el borde lateral de la escápula y se inserta en la porción inferior del troquíter. Está innervado por la rama posterior del nervio axilar (C5, C6) y vascularizado por la arteria circunfleja humeral posterior. Funciona como rotador externo y es especialmente activo con el brazo en abducción.

El músculo subescapular constituye la porción anterior del manguito de los rotadores. Tiene su origen en la fosa subescapular y su inserción en el troquíter. El subescapular funciona como rotador interno y estabilizador pasivo frente a la subluxación anterior. También funciona como depresor de la cabeza humeral. Su innervación es casi siempre doble: los nervios subescapulares superiores (C5) innervan la mitad superior y los subescapulares inferiores (C5 y C6) el 20% inferior, siendo variable el 30% restante. La irrigación de este músculo proviene de las

arterias axilar y subescapular.

b) El arco subacromial

El arco subacromial, también conocido como acromial o coracoacromial, es la superficie lisa cóncava inferior formada por la cara anterior e inferior del acromion, la apófisis coracoides y el ligamento coracoacromial¹³. Constituye el techo de la articulación glenohumeral y delimita junto con la cabeza humeral el denominado espacio subacromial, por el que se deslizan los tendones del manguito rotador en todos los movimientos de la articulación. Este proceso de deslizamiento está favorecido por la bolsa subacromial-subdeltoidea y por el líquido sinovial. En condiciones normales el espacio subacromial es un espacio virtual, en el que cualquier traslación superior comprime el manguito entre la cabeza humeral y el arco coracoacromial. A este desplazamiento humeral superior se contrapone una fuerza descendente que ejerce el arco, a través del manguito, sobre la cabeza humeral.

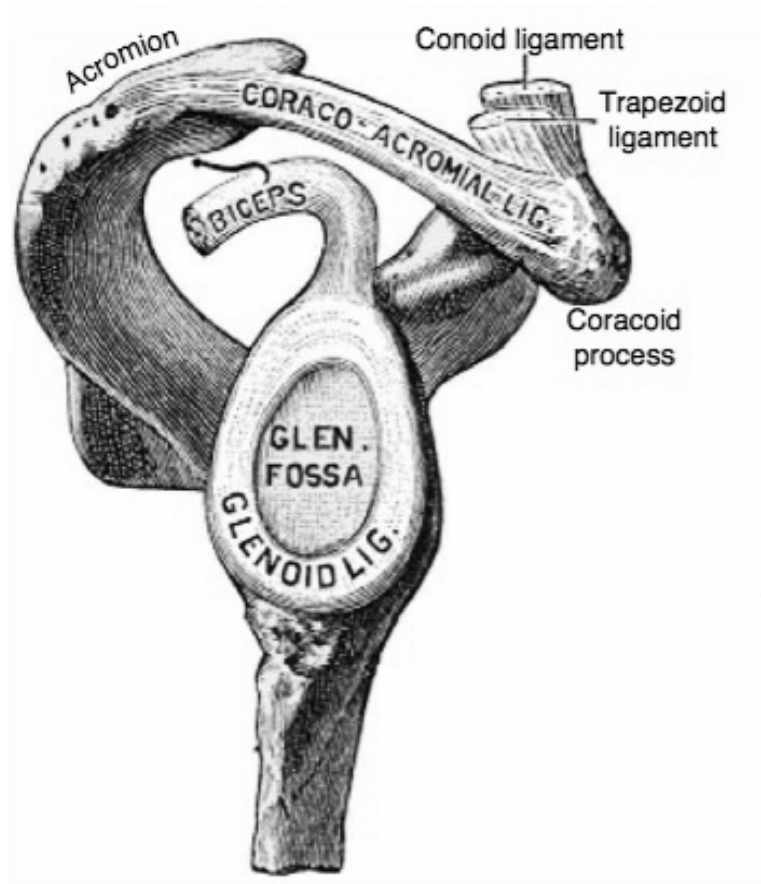


Imagen 3. Visión lateral de los componentes escapulares de la articulación glenohumeral. El acromion, el ligamento coracoacromial y la apófisis coracoides forman el arco coracoacromial.

(Gray's Atlas of Anatomy 1918 Ed. Lea y Febiger, Filadelfia).

c) La huella anatómica

El área donde se inserta el manguito rotador en el húmero se denomina huella anatómica y su estudio ha ayudado en el diagnóstico y reparación de las lesiones del manguito rotador.

Dugas¹⁴ llevó a cabo un estudio en cadáver en el que definió el área total media de inserción del manguito en el húmero como 5,53 cm², siendo la inserción más grande la del redondo menor con 2,22 cm², 1,76 cm² el infraespinoso y 1,55 cm² el supraespinoso. El autor observó que tanto la inserción del supraespinoso como la

del infraespinoso tenían una forma rectangular siendo muy similares en tamaño. También estableció la distancia media entre la inserción del manguito y la capsula articular en 1 mm.

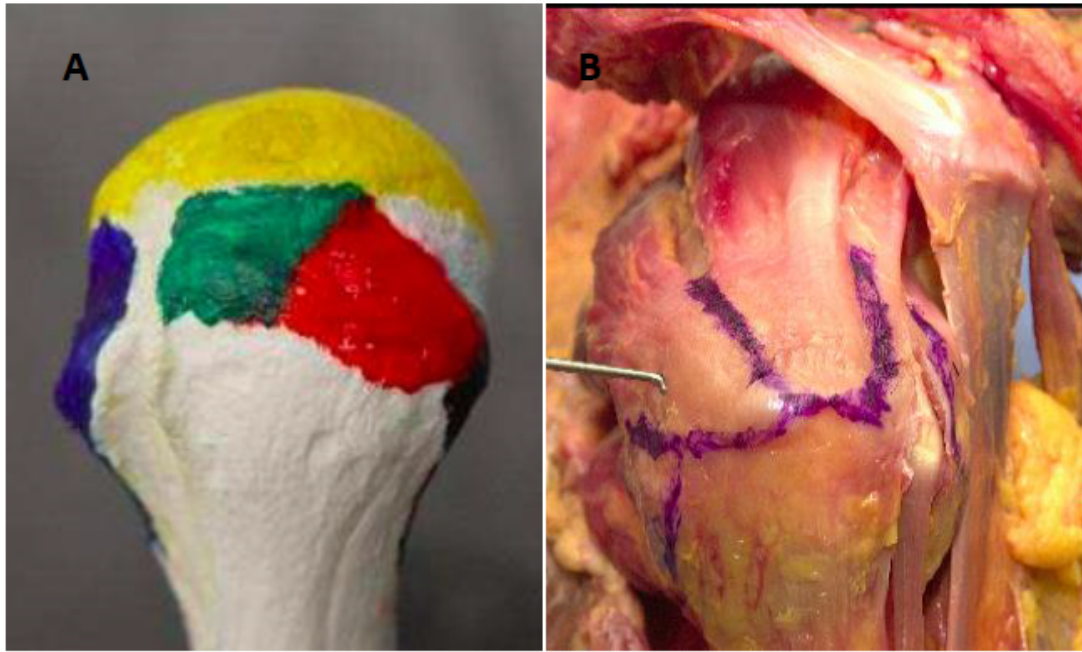


Imagen 4. A. Modelo que muestra la huella anatómica del supraespinoso (verde) e infraespinoso (rojo). La huella anatómica del subescapular (azul) es anterior al surco bicipital. B. Visión lateral del húmero con las inserciones del manguito íntegras marcadas.

(Curtis AS, Burbank KM, Tierney JJ, Scheller AD, Curran AR. The insertional footprint of the rotator cuff: an anatomic study. Arthroscopy 2006 Jun;22(6):603-609).

Mochizuki¹⁵ en un estudio más reciente encontró que la inserción del supraespinoso era más pequeña que la del infraespinoso y de forma triangular. Observó además que en un 21% de los pacientes parte de la inserción del supraespinoso se proyectaba anteriormente sobre el troquín (imagen 5).

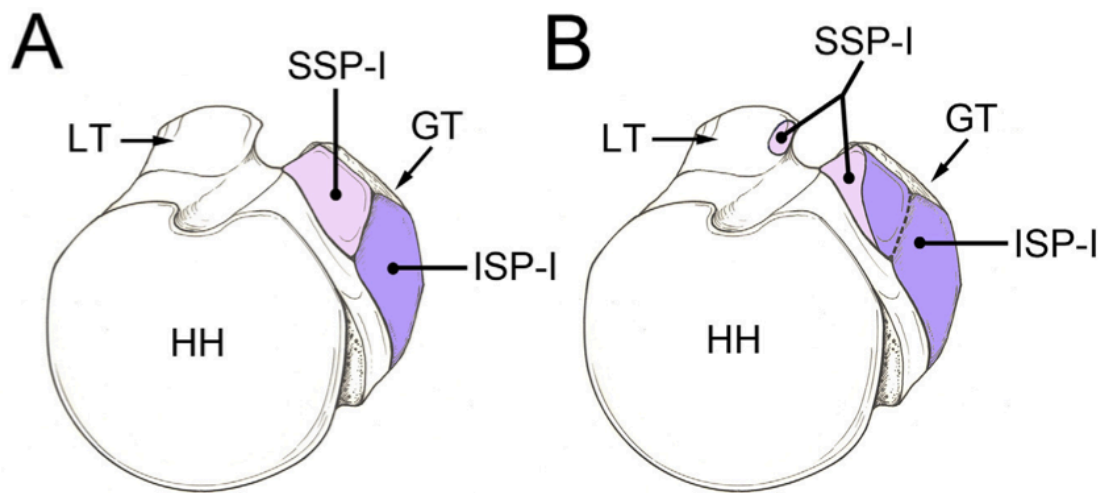


Imagen 5. Ilustraciones de un húmero derecho que muestran las inserciones del supraespinoso e infraespinoso. A. Representa el modelo más aceptado. B. Hallazgos de Mochizuki. GT troquíter, HH cabeza humeral, ISP-I inserción del infraespinoso, LT troquín y SSP-I: inserción del supraespinoso.

(Mochizuki T, Sugaya H, Uomizu M, Maeda K, Matsuki K, Sekiya I, et al. Humeral insertion of the supraspinatus and infraspinatus. New anatomical findings regarding the footprint of the rotator cuff. Surgical technique. J Bone Joint Surg Am. 2009 Mar 1;91 Suppl 2 Pt 1:1-7).

Curtis¹⁶ coincide en señalar el menor tamaño de la inserción del supraespinoso y su forma triangular debido a que las fibras del infraespinoso se extendían por la parte más lateral de la inserción del supraespinoso.

d) Histología del manguito rotador

Histológicamente se han descrito 5 capas a nivel de la confluencia entre el supraespinoso y el infraespinoso. (Clark 1992)¹¹

1. La primera capa es la más superficial y contiene fibras del ligamento coracohumeral. Es una capa ampliamente vascularizada por arteriolas.
2. En la segunda capa, las fibras vienen directamente de los tendones, formando gruesos haces paralelos entre sí.

3. La capa tercera corresponde con la zona de interdigitación entre supraespinoso, infraespinoso y subescapular. Las fibras de esta capa son menos densas y tienen una disposición oblicua de 45°, respecto a la capa anterior.
4. La cuarta capa esta constituida por la parte profunda del ligamento coracohumeral, contiene tejido conectivo y densas fibras.
5. Finalmente, la quinta capa, la más profunda, corresponde con la cápsula articular con fibras orientadas al azar.

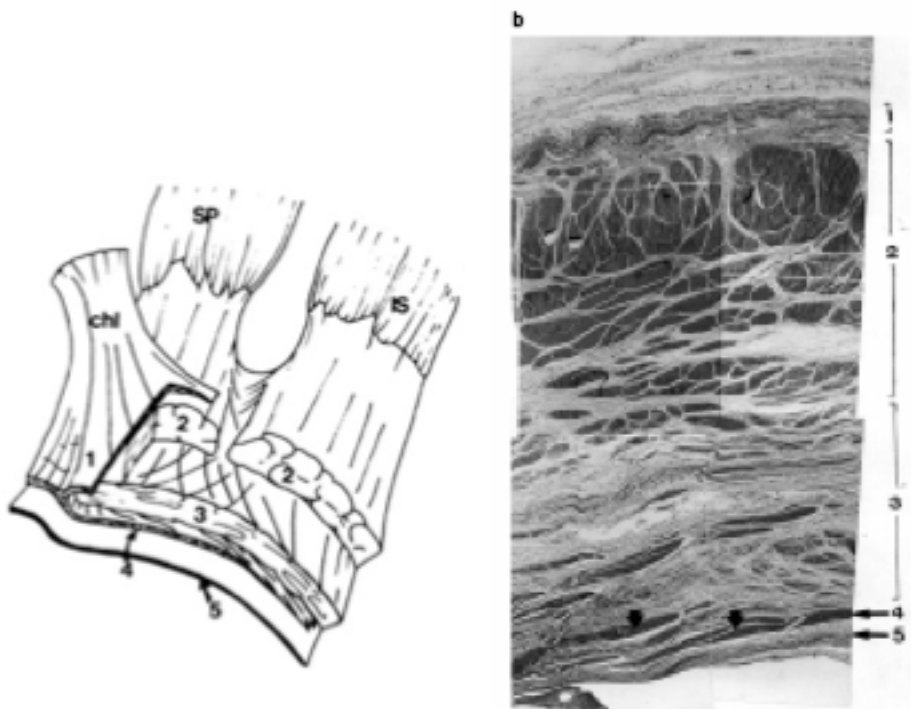


Imagen 6. Esquema de las 5 capas del complejo manguito rotador-cápsula y su equivalente histológico; chl: ligamento coracohumeral, SP: supraespinoso; IS: infraespinoso.

(Clark JM, Harryman DT 2nd. Tendons, ligaments, and capsule of the rotator cuff. Gross and microscopic anatomy. J Bone Joint Surg Am 1992 Jun;74(5):713-725).

e) Función y biomecánica del manguito rotador

La articulación glenohumeral tiene una escasa estabilidad debido a la diferencia de tamaño que existe entre la glena y la cabeza humeral. El labrum, la cápsula articular y los ligamentos glenohumerales contribuyen a aumentar esta estabilidad. Una presión intraarticular negativa también evita la traslación de la cabeza humeral¹⁷.

El manguito rotador constituye un estabilizador primario fundamental. Los músculos del manguito rotador trabajan de forma sinérgica mediante la activación e inactivación coordinada de músculos agonistas y antagonistas, creando un momento de fuerza que genera una compresión de la cabeza humeral sobre la glena y estabiliza la articulación durante el movimiento¹⁸. Los músculos del manguito que se insertan inferiormente al ecuador de la cabeza humeral mantienen el equilibrio en el plano coronal, evitando el ascenso de la cabeza humeral con la abducción. El supraespinoso inicia el movimiento de abducción pero se mantiene activo durante todo el rango de movimiento. El infraespinoso es más activo en posición neutra con el brazo a 0° de abducción y el redondo menor lo es con el brazo en 90° de abducción. En el plano axial el subescapular contrarresta las fuerzas del infraespinoso y el redondo menor. Otros músculos como el pectoral mayor, el dorsal ancho, el redondo mayor, el bíceps braquial y los músculos escapulo-torácicos también son estabilizadores activos de la articulación.

Las fibras tendinosas están también sometidas a un complejo conjunto de fuerzas. Existen fuerzas de tensión concéntrica cuando el húmero se desplaza de forma activa en la dirección de la acción del músculo del manguito. También existen fuerzas de tensión excéntrica al resistir el desplazamiento humeral en direcciones

contrarias a la acción de los músculos del manguito. Las fibras tendinosas también soportan momentos de flexión cuando la cabeza humeral rota en relación a la escápula y fuerzas de compresión al aplicar cargas de orientación superior que comprimen el tendón entre la cabeza humeral y el arco subacromial. Se ha calculado que en las actividades normales la fuerza transmitida a través del tendón supraespinoso es de 140 N a 200 N¹⁹.

f) Roturas del manguito rotador

i. Epidemiología de las roturas del manguito rotador

Numerosos investigadores han tratado de estimar la prevalencia de roturas de manguito en estudios de disecciones anatómicas. Neer²⁰ observó en más de 500 cadáveres roturas de espesor completo en menos del 5% de ellos. Sin embargo, Lehman y cols²¹ encontraron un 17% de roturas de espesor completo en 235 cadáveres. La prevalencia era del 6% en especímenes menores de 60 años y del 30% en mayores de 60 años.

Otros autores han evaluado la frecuencia de lesiones de manguito en pacientes asintomáticos con RMN y ecografía. Sher y cols.²² encontraron que la prevalencia de rotura del manguito en pacientes asintomáticos era del 34% usando RMN, 15% de espesor completo y 20% de espesor parcial. La mayoría de las roturas se observaban en pacientes mayores de 60 años con un 28% de los hombros presentando roturas de espesor completo y un 26% de espesor parcial, frente al 4% y 24%, respectivamente, en pacientes entre 40 y 60 años. En menores de 40 años no se observaron roturas de espesor completo y sólo un 4% tenían roturas de espesor parcial. Tempelhof y cols.²³ mediante ecografía describieron una prevalencia global de roturas de espesor completo en pacientes asintomáticos del

23%, con un 51% de roturas en pacientes mayores de 80 años.

El problema de los estudios previamente descritos es que sólo evaluaban pacientes asintomáticos. Yamaguchi y cols.¹ realizaron una revisión ecográfica bilateral de 588 pacientes con dolor unilateral de hombro. Determinaron que la prevalencia de roturas del manguito aumentaba con la edad. Las roturas completas eran más frecuentemente sintomáticas que las roturas parciales. La probabilidad de tener una rotura de espesor completo contralateral en un paciente sintomático era del 35.5%, aumentando a un 50% en pacientes mayores de 66 años.

En un estudio más reciente, Yamamoto y cols.²⁴ publicaron un estudio poblacional. En él estudiaron con ecografía 1366 hombros, sintomáticos y asintomáticos, en una ciudad de Japón. Observaron que el 20,7% de los hombros presentaban roturas de manguito. Éstas eran más frecuentes en los pacientes mayores y en los pacientes sintomáticos, 36 %, frente al 16,9% en los asintomáticos. Establecieron como factores de riesgo la dominancia del brazo, la edad y antecedente traumático.

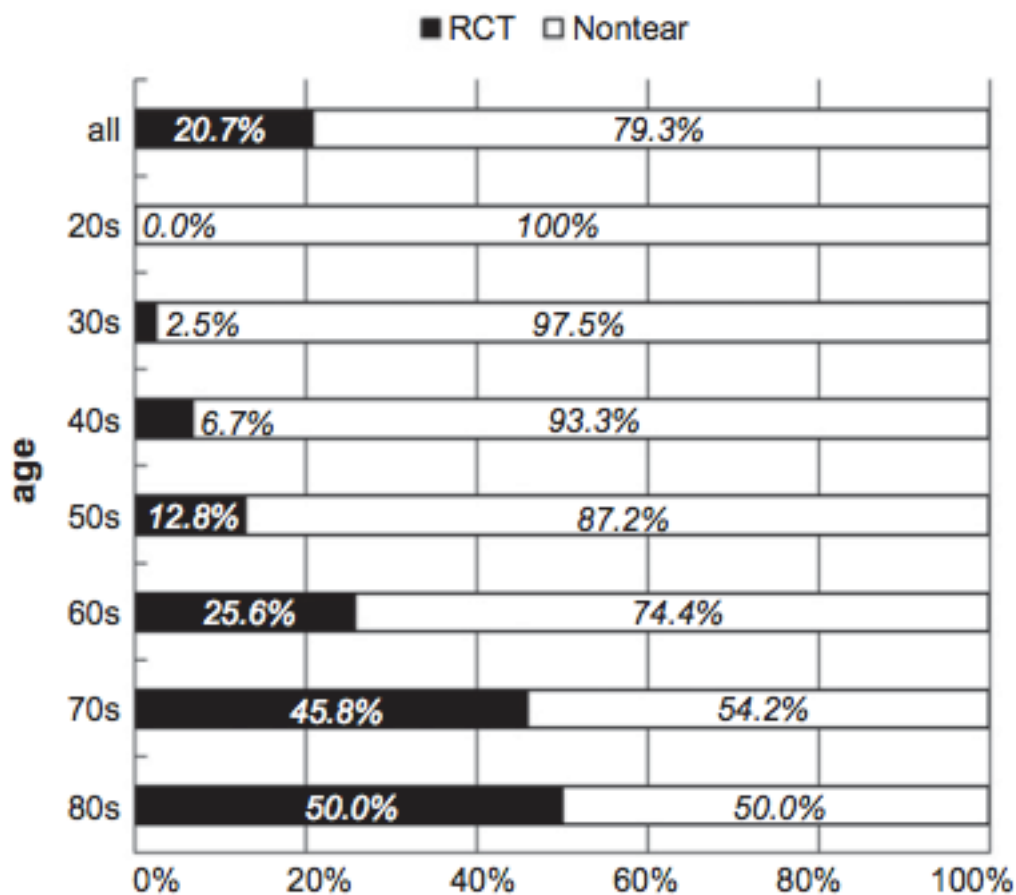


Tabla 1. Porcentaje de roturas de manguito y manguitos íntegros globalmente y según la edad. RCT: rotura de manguito, Nontear: manguito íntegro.

(Yamamoto A, Takagishi K, Osawa T, Yanagawa T, Nakajima D, Shitara H, Kobayashi T. Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. *J Shoulder Elbow Surg* 2010 Jan;19(1):116–120).

ii. Fisiopatología de las roturas del manguito rotador

La patogenia de las roturas del manguito rotador es todavía incierta, existen fundamentalmente dos teorías: la extrínseca y la intrínseca.

Teoría extrínseca

La teoría extrínseca fue popularizada por Neer²⁵ en 1972. Describió un compromiso mecánico o “impingement” de los tendones del manguito rotador bajo la porción antero-lateral del acromion que ocurría cuando el hombro se situaba en flexión y rotación interna. Neer creía que la causa de la degeneración y

consecuente rotura del manguito rotador era el compromiso que existía bajo el arco coracoacromial, que era rígido. Por eso, proponía como tratamiento la realización de una acromioplastia asociada a la reparación del manguito rotador. De acuerdo con esta teoría Bigliani²⁶ describió en 1986 tres tipos de acromion: plano, curvado y ganchoso. Numerosos estudios han observado una relación entre la presencia de un acromion ganchoso y la patología del manguito rotador. Sin embargo, la gran variabilidad interobservador pone en duda la utilidad de esta clasificación.

Otra característica acromial que se ha relacionado con la patología del manguito rotador es la presencia de un espolón acromial. Ogawa y cols.²⁷ en un estudio que combinaba disecciones anatómicas en cadáver, pacientes intervenidos y controles, mostraron una relación entre la presencia de espolones y lesiones bursales del manguito. Sin embargo, no está claro si el espolón es consecuencia de la patología de manguito o su origen.

Recientemente, se han publicado trabajos que relacionan la longitud del acromion y la frecuencia de lesiones del supraespinoso. Nyffeler y cols.²⁸ describieron el índice acromial, que valora el desplazamiento lateral del acromion, en relación a la cabeza humeral. Hallaron que un mayor índice acromial estaba asociado con roturas de espesor completo del supraespinoso. En su trabajo, el índice acromial medio en pacientes con rotura de supraespinoso fue 0,73 y 0,64 en pacientes sin lesión del manguito. Moor y cols.^{29,30} describieron el ángulo crítico del hombro, que valora la inclinación de la fosa glenoidea, además de la lateralización del acromion. Observaron una relación entre un mayor ángulo crítico del hombro y la frecuencia de lesiones del tendón del supraespinoso. Publicaron una media de 33,1° en el

grupo control o de hombros sanos, 38° en el grupo con lesiones del supraespinoso y $28,1^\circ$ en el grupo con artrosis. La hipótesis desarrollada por los autores consiste en que la lateralización del acromion produce una verticalización de las fibras del deltoides. Esto aumentaría la fuerza excéntrica o de ascenso sobre la cabeza humeral, generando una sobrecarga sobre el tendón supraespinoso que podría favorecer su lesión. En el otro extremo, un acromion corto horizontaliza las fibras del deltoides, incrementando la fuerza de compresión disminuyendo la tensión del supraespinoso.

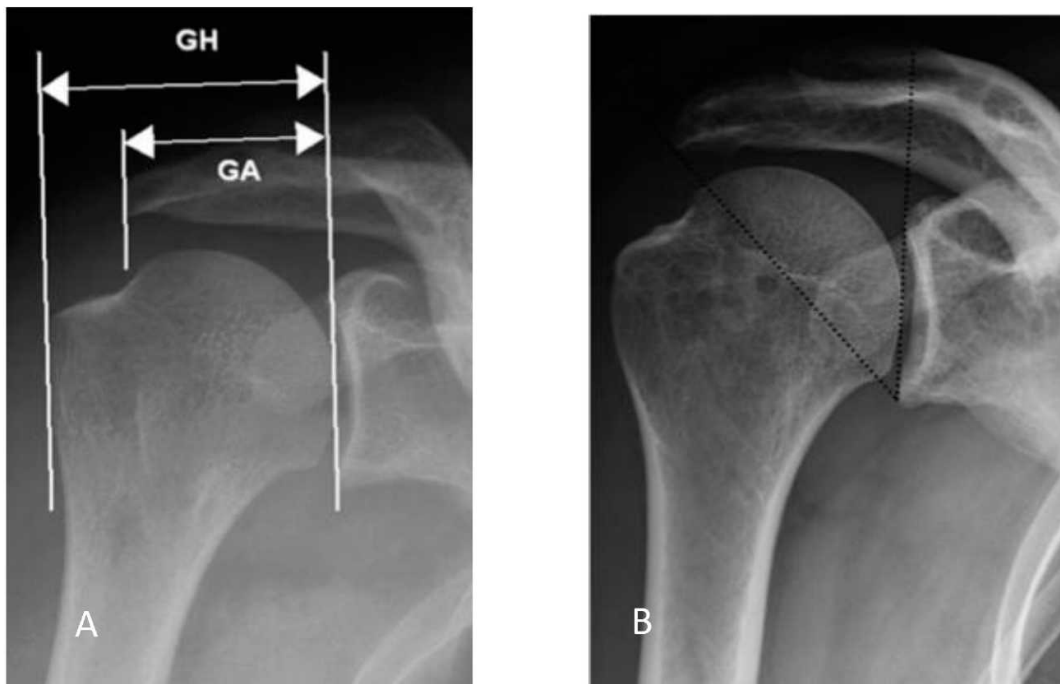


Imagen 7. La imagen A muestra como se mide el índice acromial: índice acromial = distancia desde el plano de la glenoides al plano del borde lateral del acromion (GA), dividido entre la distancia desde el plano de la glenoides al borde lateral del húmero (GH).

(Nyffeler RW, Werner CML, Sukthankar A, Schmid MR, Gerber C. Association of a large lateral extension of the acromion with rotator cuff tears. J Bone Joint Surg Am 2006 Apr; 88(4):800–805).

La imagen B muestra el método de medición del ángulo crítico del hombro.

(Moor BK, Röthlisberger M, Müller DA, Zumstein MA, Bouaicha S, Ehlinger M, Gerber C. Age, trauma and the critical shoulder angle accurately predict supraspinatus tendon tears. Orthop Traumatol Surg Res 2014 Sep;100(5):489-494).

Teoría intrínseca

En segundo lugar, la teoría intrínseca considera que la patología del manguito rotador es causada por la degeneración intrínseca del tendón debido al envejecimiento, una pobre vascularización y una biología alterada (Clark)¹¹. Se producen cambios en la composición y estructura de la matriz extracelular: colágeno, proteoglicanos y contenido porcentual de agua.

La teoría sobre el defecto de irrigación del manguito es controvertida. Estudios vasculares han identificado una zona crítica, avascular, 1 cm proximal a la inserción del tendón (Moseley, Lohr)^{31,32}. Sin embargo, otros estudios han mostrado hallazgos contradictorios. Fukuda y cols. identificaron una hiperperfusión relativa en la zona crítica en roturas parciales³³.

Yamamoto y cols.²⁴ identificaron como factores de riesgo un antecedente traumático, la aparición sobre el brazo dominante y la edad. La hipercolesterolemia, el tabaquismo y la predisposición genética han sido implicados también en la fisiopatología³⁴. Carbone y cols.³⁵ han publicado recientemente que existe una correlación entre el número de cigarrillos fumados y la incidencia y el tamaño de las roturas. Además, se ha identificado un componente genético en el desarrollo de la patología de manguito rotador al estudiar la frecuencia de lesión de manguito en hermanos, esta mayor prevalencia podría estar en relación al polimorfismo de los genes de colágeno³⁶.

Actualmente, se cree que las roturas del manguito rotador se producen por una combinación de ambas teorías.

Patogenia

La rotura del manguito rotador provoca cambios en la cinemática articular que pueden evolucionar en su fase final a la artropatía de manguito. Radiográficamente, se caracteriza por una migración superior de la cabeza humeral, acetabularización del acromion y disminución del espacio subacromial. Existen numerosas teorías acerca de la historia natural de este proceso. Algunos autores defienden la teoría de que la acción depresora del tendón supraespinoso se pierde y eso supone el ascenso de la cabeza humeral cuando se intenta realizar abducción del hombro. Sin embargo, teorías más recientes basan este desequilibrio en una pérdida del par de fuerzas transversal entre la porción más anterior del manguito, el músculo subescapular, y la porción más posterior, los músculos infraespinoso y redondo menor³⁷.

Oh y cols.³⁸ han demostrado que la rotura completa del tendón supraespinoso constituye el estadio crítico para aumentar la capacidad de rotación del hombro y disminuir la capacidad de abducción. Sin embargo, es la progresión de la rotura hacia el infraespinoso la que supondría la aparición de cambios en la cinemática de la cabeza humeral. El pectoral mayor y el dorsal ancho se consideran elementos importantes para estabilizar la cabeza durante el progreso de la rotura.

Cuando el manguito empieza a degenerarse, las fibras de colágeno sufren una degeneración hialina y mixoide y el hueso sufre una metaplasia para convertirse en tejido condroide. Se aprecia una menor cantidad de colágeno global con una presencia mayor del 5% de colágeno tipo III³⁹. Se pueden apreciar procesos de inflamación, calcificación, proliferación vascular e infiltración grasa, no sólo en la zona de inserción del tendón, sino en todo el espesor muscular. Se han descrito dos

fenómenos característicos: la infiltración grasa, que consiste en la sustitución de las fibras musculares por grasa y la atrofia muscular, que consiste en una disminución del volumen del músculo. Estos fenómenos histológicos y macroscópicos tienen una contrapartida biomecánica con una disminución de la capacidad para ejercer fuerza.

iii. Clasificaciones de las roturas del manguito rotador

Existen numerosas clasificaciones en uso en la actualidad, haciendo difícil la comparación de resultados:

- En función del espesor de la rotura: las roturas que afectan menos de 6 mm o el 50% de espesor del tendón se consideran parciales, por encima, completas. Algunos autores como Habermayer han subdividido las roturas parciales según su extensión en el plano coronal y sagital⁴⁰.

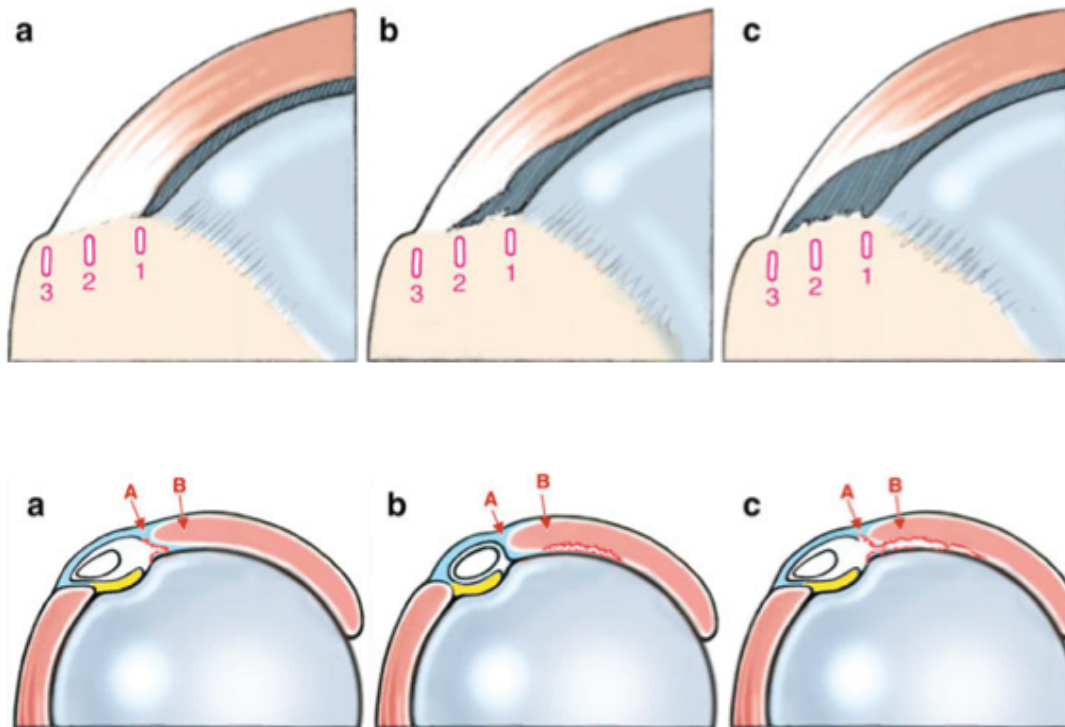


Imagen 8. Figuras esquemáticas de la clasificación de Harbermayer sobre las roturas parciales del supraespinoso.

Imagen superior: clasificación de Harbermayer de las roturas parciales del supraespinoso en el plano coronal, basada en la extensión longitudinal de las roturas articulares del tendón del supraespinoso en un plano coronal. Imagen a, tipo 1: pequeña rotura en la transición entre el cartílago y el hueso. Imagen b, tipo 2: extensión de la rotura hasta el centro de la huella anatómica. Imagen c, tipo 3: extensión de la rotura hasta el troquíter.

Imagen inferior: clasificación de Harbermayer de las roturas parciales del supraespinoso en el plano sagital, basada en la extensión de las roturas articulares del tendón del supraespinoso en un plano axial. Imagen a, tipo A: rotura del ligamento coracohumeral que continúa hasta el borde medial del tendón del supraespinoso. Imagen b, tipo B: rotura aislada en "C". Imagen c, tipo C: rotura del ligamento coracohumeral que se extiende al supraespinoso con una rotura en "C".

(Harbermeyer P, Krieter C, Tang KL, Lichtenberg S, Magosch P. A new arthroscopic classification of articular-sided supraspinatus footprint lesions: a prospective comparison with Snyder's and Ellman's classification. J Shoulder Elbow Surg 2008 Nov-Dec; 17(6):909-913).

- En función del tamaño: DeOrio y Cofield⁴¹ clasificaron las roturas como pequeñas, cuando eran menores de 1 cm, medianas si eran entre 1 y 3 cm, grandes entre 3 y 5 cm y masivas si eran mayores de 5 cm.

- Número de tendones afectados: Harryman⁶ desarrolló un sistema de clasificación según el número de tendones afectados:
 - Grado IA, rotura parcial del supraespinoso.
 - Grado IB, rotura completa del supraespinoso.
 - Grado II, rotura del supraespinoso y parte del infraespinoso.
 - Grado III, rotura completa del supraespinoso, infraespinoso y subescapular.
 - Grado IV, artropatía de manguito.
- En función de la cronología: Se considera una lesión aguda aquella en la que han pasado menos de 3 meses desde el inicio del dolor, en un hombro previamente asintomático. Se considera crónica si han pasado más de 3 meses desde el hecho desencadenante. También existen reagudizaciones de lesiones crónicas, que generalmente se relacionan con un aumento de tamaño en una lesión preexistente.
- Según la forma de la rotura: Burkhart⁴² describió en su trabajo una clasificación geométrica basada en estudios de RMN preoperatorios:
 - Tipo 1 son roturas con forma de media luna ("*crescent*").
 - Tipo 2 son roturas longitudinales, pudiendo ser con forma de "L" o "U".
 - Tipo 3 son roturas masivas y contraídas medialmente.
 - Tipo 4 son roturas masivas con artropatía de manguito.

Esta clasificación tiene interés para planificar el tipo de reconstrucción y las liberaciones necesarias durante la cirugía.

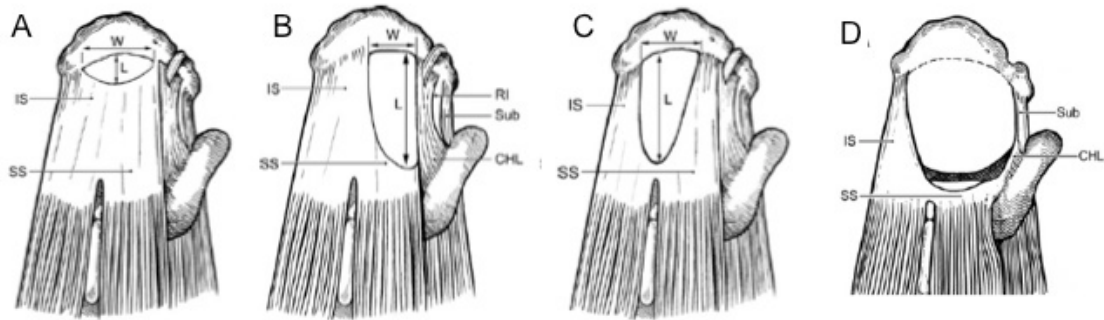


Imagen 9. Esquema de los diferentes tipos de rotura del manguito rotador en la clasificación geométrica A) Rotura tipo "Crescent"; B) Rotura longitudinal tipo "L" C) Rotura longitudinal tipo "U" D) Rotura masiva con retracción medial. W: anchura; L: longitud; RI: intervalo rotador; Sub: subescapular; chl: ligamento coracohumeral; SS: supraespinoso; IS: infraespinoso.

(Davidson J, Burkhart SS. The geometric classification of rotator cuff tears: a system linking tear pattern to treatment and prognosis. *Arthroscopy* 2010 Mar;26(3):417-424).

- Calidad del tendón: se ha relacionado la infiltración grasa y atrofia muscular con un peor resultado tras la reparación del manguito.
 - Goutallier⁴³ introdujo una clasificación de la infiltración grasa basada en la sustitución grasa del músculo visto en un corte sagital de TAC. Grado 0 corresponde a músculo normal, grado I músculo con alguna veta grasa, grado II hay más músculo que grasa, grado III hay tanta grasa como músculo y grado IV existe más grasa que músculo.
 - Thomazeau⁴⁴ posteriormente modificó dicha clasificación para poder realizar el análisis mediante RMN, prueba preoperatoria más utilizada en este tipo de pacientes.
 - Warner⁴⁵ realizó una clasificación de la atrofia muscular del supraespinoso e infraespinoso en función de la masa muscular vista en un corte en el plano sagital de RMN.

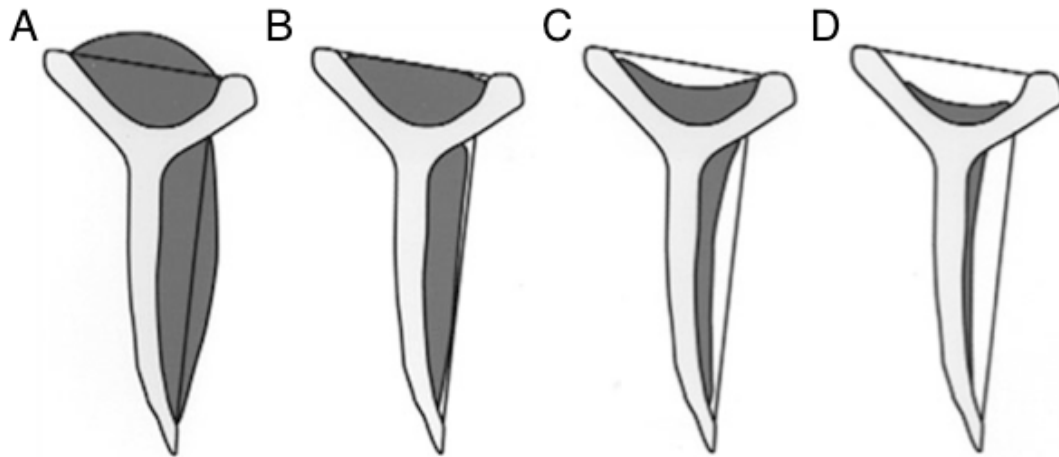


Imagen 10. Clasificación de Warner de la atrofia del manguito rotador. La clasificación se basa en la relación entre el músculo y una línea recta trazada entre la coracoides a la espina de la escápula para medir el supraespinoso y una línea entre la coracoides y la punta de la escápula para medir el infraespinoso. A no atrofia, B leve, C moderada, D severa.

(Warner JJ, Higgins L, Parsons IM, Dowdy P. Diagnosis and treatment of anterosuperior rotator cuff tears. J Shoulder Elbow Surg 2001 Jan-Feb; 10(1):37-46).

- Clasificaciones combinadas: algunos autores han realizado clasificaciones que valoran varios aspectos al mismo tiempo.
 - Patte⁴⁶ desarrolló una clasificación que combinaba extensión de la rotura, topografía en plano sagital y coronal, calidad de los músculos y estado de la porción larga del bíceps. La parte más usada de su clasificación es la retracción del supraespinoso en el plano coronal:
 - Grado I retracción mínima.
 - Grado II retracción medial a la huella pero no llega a la glenoides
 - Grado III retracción a nivel de la glena.

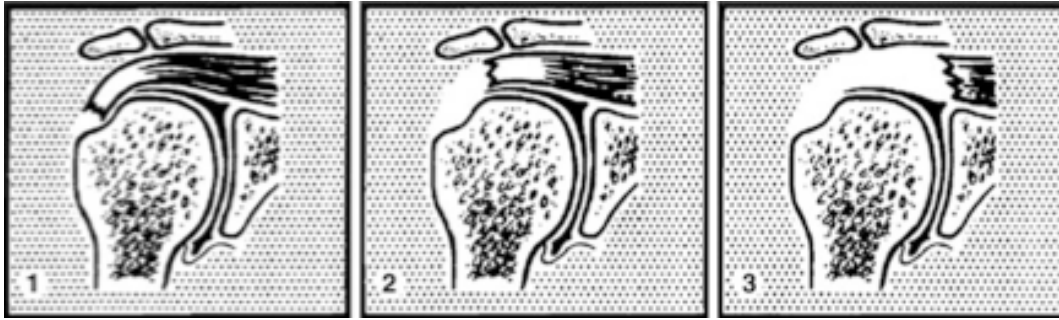


Imagen 11. Clasificación de Patte de las roturas del manguito rotador. 1 rotura de espesor completo con escasa retracción, 2 retracción hasta la cabeza humeral, 3 retracción hasta el plano de la glenoides.

(Patte D. Classification of rotator cuff lesions. Clin Orthop Relat Res 1990 May;254:81-86).

- La clasificación de Snyder⁴⁷ divide las roturas en parcial articular, parcial bursal o completa, y las subdivide según la extensión de la rotura.

iv) Reparación de las roturas de espesor completo del manguito rotador

El objetivo del tratamiento de las roturas del manguito rotador es disminuir el dolor y mejorar la función del hombro. El tratamiento conservador puede ser una opción cuya duración y objetivos deben ser individualizados en función de la respuesta al mismo y las necesidades funcionales del paciente, aunque existe el riesgo de progresión de la lesión y el desarrollo de cambios artrósicos en la articulación⁴⁸. Consiste en modificar las actividades que desencadenan el dolor, el uso de antiinflamatorios y una terapia de rehabilitación cuyos objetivos son fortalecer el manguito y la musculatura periescapular. Las infiltraciones subacromiales con corticoides son controvertidas ya que aunque disminuyen el dolor y mejoran la movilidad de forma inmediata, podrían provocar degeneración tendinosa a largo plazo y no modifican la historia natural de las lesiones del

manguito rotador⁴⁹.

El tratamiento conservador podría recomendarse en pacientes mayores de 70 años con roturas atraumáticas, roturas con hombros funcionales y dolor leve, roturas masivas con cambios irreversibles, importante infiltración grasa, migración proximal de la cabeza humeral o artrosis establecida. También sería una indicación relativa en pacientes de cualquier edad con roturas pequeñas de menos de un 1 cm.

La decisión de optar por el tratamiento quirúrgico debe basarse en el tamaño y cronicidad de la lesión, en la presencia de cambios irreparables en el manguito o en la articulación glenohumeral y en la edad del paciente. La indicación ideal del tratamiento quirúrgico serían roturas de tamaño mediano, mayores de 1 cm, que sean agudas, principalmente en pacientes jóvenes³⁴. Las denominadas roturas agudas sobre crónicas constituyen otro grupo candidato a una intervención quirúrgica y se manifiestan clínicamente como roturas agudas, con pérdida súbita de fuerza y movilidad a cualquier edad. La reparación del manguito rotador puede realizarse mediante cirugía abierta o artroscopia. Pueden asociarse gestos quirúrgicos que actúan sobre la superficie inferior del acromion, la articulación acromioclavicular o el tendón de la porción larga del bíceps. La cirugía abierta se realiza mediante un abordaje anterosuperior, desinsertando la región anterior del deltoides⁵⁰. También se ha descrito la técnica “mini-abordaje” en la que las fibras del deltoides se separan y no se desinsertan⁵¹. En ambos casos la cirugía consiste en la sutura directa del tendón al hueso, en la región correspondiente del troquíter, utilizando una sutura gruesa, generalmente no reabsorbible. La técnica artroscópica se realiza generalmente mediante tres o más portales a través de los

cuales se identifica y repara la lesión. La sutura se realiza mediante anclajes que se colocan en la región correspondiente e intenta reproducir la inserción anatómica del tendón. Para ello se han descrito numerosas técnicas de reparación con una o dos hileras de suturas, con el fin de aumentar la superficie de contacto del tendón en el lecho humeral⁵². A pesar de la gran utilización de las técnicas artroscópicas mediante anclajes con buenos resultados, algunos autores han propuesto en los últimos años la sutura transósea del tendón mediante artroscopia o asistida por mini abordaje (“mini-open”). La limitación a la utilización de estas técnicas lo constituye la calidad ósea del paciente. La resistencia al fracaso de los anclajes actuales es mayor que la sutura de alta resistencia. El objetivo de cualquier técnica es conseguir una superficie de contacto mayor, evitando el micromovimiento en la zona de reparación y así favorecer la cicatrización⁵³.

El protocolo de rehabilitación postquirúrgica depende del tamaño de lesión y de la calidad del tejido reparado. En general, la movilidad activa libre y los ejercicios de fortalecimiento no se inician hasta las 6 u 8 semanas postoperatorias. El período para la rehabilitación completa puede durar entre 6 y 12 meses⁵⁴. Recientemente, Keener y cols.⁵⁵. han publicado sus resultados, comparando un protocolo de movilización pasiva precoz con un protocolo de inmovilización, sin encontrar diferencias con respecto a la tasa de curación o la existencia de rigidez.

v) Resultados de la reparación del manguito rotador

Los resultados en la cirugía de reparación del manguito rotador son variables debido a la heterogenidad en el diagnóstico, las distintas técnicas disponibles y en la valoración de los resultados.

Cirugía abierta vs artroscópica

Para roturas de espesor completo, la cirugía abierta proporciona resultados satisfactorios en un 87,5% de los casos en cuanto a mejoría del dolor y grado de satisfacción del paciente⁵⁶. La principal complicación que se ha descrito es la debilidad en flexión anterior y con el uso del brazo por encima de la cabeza, la cual puede deberse al fracaso de la reparación o a una desinserción o denervación de la porción anterior del deltoides⁵⁷. Los resultados de la cirugía artroscópica son similares, con resultados satisfactorios en el 85-95% de los casos y ciertos beneficios respecto a la cirugía abierta, como son menor dolor postoperatorio, menor riesgo de lesión del deltoides y una recuperación precoz⁵⁸.

En un estudio que comparaba cirugía abierta y artroscópica no se encontraron diferencias en la escala de Constant, movilidad ni cicatrización⁵⁹. Bishop⁴ demostró que los resultados de la cirugía abierta eran superiores en roturas grandes y masivas frente a cirugía artroscópica (62% y 40% respectivamente). Sin embargo, revisiones sistemáticas recientes no han encontrado diferencias entre ambas técnicas⁶⁰⁻⁶².

Cicatrización tras la reparación

La falta de cicatrización del manguito rotador tras la reparación es un problema frecuente con una implicación clínica todavía incierta. La incidencia es muy variable, entre un 11% y un 94% según los estudios y la técnica utilizada para su diagnóstico.

Estudio	Técnica de imagen	Nº de hombros	Nº de hombros cicatrizados
Anderson y cols. (2006) ⁶³	Eco	52	43 (83%)
Bishop y cols. (2006) ⁴	RMN	72	43 (60%)
Boileau y cols. (2005) ⁶⁴	TAC y RMN	65	46 (71%)
Carbonel y cols. (2013) ⁶⁵	RMN	82	58 (71%)
Castagna y cols. (2008) ⁶⁶	Eco	29	18 (62%)
Charousset y cols. (2010) ⁶⁷	TAC	81	47 (58%)
Cho y cols. (2009) ⁶⁸	RMN	169	115 (68%)
Choi y cols. (2012) ⁶⁹	Eco	41	33 (80%)
Choi y cols. (2014) ⁷⁰	RMN	147	122 (83%)
Gartsman y cols. (2013) ⁷¹	Eco	83	70 (84%)
Hayashida y cols. (2012) ⁷²	RMN	47	40 (85%)
Harryman y cols. (1991) ⁶	Eco	105	68 (65%)
Ide y cols. (2015) ⁷³	RMN	61	48 (62%)
Kim y cols. (2012) ⁷⁴	RMN o Eco	50	36 (78%)
Iannotti y cols. (2013) ⁷⁵	RMN	113	94 (83%)
Lapner y cols. (2012) ⁷⁶	RMN o Eco	76	55 (72%)
Mihata y cols. (2011) ⁷⁷	RMN	195	177 (91%)
Neyton y cols. (2013) ⁷⁸	RMN	107	96 (90%)
Nho y cols. (2009) ⁶⁰	Eco	93	63 (68%)
Oh y cols. (2011) ⁷⁹	TAC	53	31 (59%)
Toussaint y cols. (2011) ⁸⁰	TAC o RMN	154	132 (86%)
Voigt y cols. (2010) ⁸¹	RMN	45	32 (71%)

Tabla 2. Tabla que compara la frecuencia de cicatrización de los hombros reparados quirúrgicamente y la técnica de imagen empleada para su evaluación

Las técnicas quirúrgicas introducidas tienen el objetivo de mejorar la cicatrización del tendón al aumentar la superficie de contacto con la huella anatómica. Sin embargo, ni siquiera estas técnicas avanzadas consiguen una cicatrización constante, lo que señala la importancia de los factores biológicos en la reparación. Numerosos estudios han mostrado mejoría en el dolor y en la percepción subjetiva de los resultados por el paciente, independientemente de la cicatrización de la reparación^{63,68,69,76}. Sin embargo, las escalas que evalúan la fuerza y la movilidad activa (Constant, UCLA) si han demostrado mayor mejoría en los casos de cicatrización del tendón^{64,66-69,72,76-80}.

Estudio	Dolor		Fuerza			Resultado		
	C	RR	Sistema de medida	C	RR	Escala	C	RR
Anderson y cols. (2006) ⁶³			Clínicamente (proporción contralateral)	1,05	0,62	L'Insalata	92	94
Boileau y cols. (2005) ⁶⁴						Constant	86	79
Carbonel y cols. (2013) ⁶⁵						ASES	84	72
Castagna y cols. (2008) ⁶⁶						Constant	73	55
Charousset y cols. (2010) ⁶⁷				9,5 (Kg)	4,7 (kg)	Constant	82	72
Cho y cols. (2009) ⁶⁸	1,5 (EVA)	1,6 (EVA)	Dinamómetro	7,9 (Kg)	5,3 (Kg)	ASES UCLA	92 33	91 32
Choi y cols. (2012) ⁶⁹						ASES UCLA Constant	96 33 93	90 31 82
Hayashida y cols. (2012) ⁷²						ASES UCLA	93 33	80 27
Iannotti y cols. (2013) ⁷⁵			Dinamómetro (comparación contralateral)	92%	75%			
Ide y cols. (2015) ⁷³	27 (0-30)	20 (0-30)	Clínicamente	4,8 (0-5)	3,5 (0-5)			
Lapner y cols. (2012) ⁷⁶				7,2 (Kg)	4,9 (Kg)	ASES Constant	88 83	81 74
Mihata y cols. (2011) ⁷⁷						ASES UCLA	98 35	77 27
Neyton y cols. (2013) ⁷⁸	13 (5-15)	11 (5-15)				Constant	81	73
Nho y cols. (2009) ⁸⁵			Dinamómetro	4,9 (Kg)	4,3 (Kg)	ASES	94	88
Oh y cols. (2011) ⁷⁹	2 (EVA)	1 (EVA)				Constant ASES	85 86	76 92
Toussaint y cols. (2011) ⁸⁰	13 (0-15)	11,5 (0-15)	Dinamómetro	8,9 (kg)	5,7 (kg)	Constant	82	73
Voigt y cols. (2010) ⁸¹	15 (5-15)	15 (5-15)	Dinamómetro	10 (N)	10 (N)	Constant	93	94

Tabla 3. Tabla que compara los resultados de la cicatrización (C) o rerrotura (RR) del manguito tras la reparación quirúrgica.

Factores que influyen en la cicatrización

Numerosos estudios han demostrado diferencias en la cicatrización con el incremento de la edad⁶⁸. El tamaño de la lesión también influye de forma determinante en los resultados, teniendo las lesiones de gran tamaño peores tasas de cicatrización. Mihata y cols.⁷⁷ encontraron, usando RMN, que un 4% de las lesiones pequeñas y medianas no cicatrizaron, frente a un 22% de las lesiones masivas. Nho y cols.⁸⁴ demostraron cicatrización en un 90% de las roturas de un único tendón en comparación con un 49% de las lesiones de varios tendones. La calidad del tendón es otro de los factores más importantes que influyen en el resultado. La infiltración grasa^{67,68} y la atrofia muscular disminuyen la cicatrización del tendón reparado. Usando la clasificación de infiltración grasa de Goutallier, Voigt y cols.⁸¹ encontraron un 85% de falta de cicatrización en hombros grado 2 o superior, frente a un 41% en grados menores. Otros factores que se han relacionado con una menor cicatrización son la retracción del tendón^{50,85}, el grado de disfunción preoperatoria y el hecho de que el paciente pertenezca al entorno laboral.

Se han descrito numerosos factores técnicos que pueden influir en la cicatrización de la reparación. Además de analizar la forma adecuada de suturar cada tipo de lesión, se han desarrollado nuevas técnicas de sutura que intentan reproducir de forma más exacta la anatomía de la inserción del tendón y maximizar la superficie de contacto hueso-tendón. Existe controversia sobre el uso de la hilera simple o doble. Aunque parece ser que las suturas en doble hilera proporcionan una mayor

resistencia biomecánica⁸⁶ y de que presentan tasas de rerrotura menores, no se ha visto que sus resultados sean clínicamente relevantes⁸⁷. Se han estudiado ampliamente el tipo de anclaje, la sutura que porta el anclaje y la orientación en la que éste se introduce en el húmero. Milano y cols⁸⁸. en un estudio prospectivo aleatorizado, compararon los anclajes metálicos con los biodegradables, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos con un seguimiento mínimo de dos años. También se ha descrito en los últimos años, la utilización de anclajes con tres suturas, que permitirían colocar menor número de anclajes para la reparación de una misma lesión y distribuir la tensión de la reparación a través de más puntos⁸⁹.

Más recientemente, estudios en modelos animales de manguito rotador o ligamento cruzado han indicado que la causa del fracaso en la reparación hueso-tendón podría tener un origen biológico y deberse a la incapacidad de regenerar el tejido especializado que existe en esta interfase y que se denomina entesis⁸. Debido a estos hallazgos, los esfuerzos científicos se han centrado en crear un ambiente biológico que favorezca la cicatrización y que se expondrán en profundidad en el apartado 4.

1) La entesis

a) Estructura y composición tendinosa

La estructura del tendón esta compuesta por un componente celular y una matriz extracelular. El componente celular fundamental son los tenocitos, que conforman el 90-95% de las células, el 5-10% restante son condrocitos, células sinoviales y vasculares. Los tenocitos son los productores de la matriz extracelular. Son células fusiformes en el plano longitudinal y estrelladas en el eje transversal. Poseen

numerosas ramificaciones que se prolongan entre las fibras de colágeno de la matriz. La matriz extracelular esta formada en un 70% por agua, el 30% restante es fundamentalmente colágeno tipo I (65-80%) y elastina (2%)^{90,91}.

La fibrilla es la unidad estructural más pequeña, esta compuesta por moléculas de colágeno agrupadas, formando microfibrillas, que a su vez forman subfibrillas. Los haces de fibrillas se denominan fascículos y se encuentran unidos por una fina capa de tejido conjuntivo laxo denominado endotenon, el cual posee vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Los haces de fascículos a su vez se agrupan formando el tendón. Están rodeados por el epitenon, relativamente innervado e irrigado por vasos sanguíneos y linfáticos⁹².

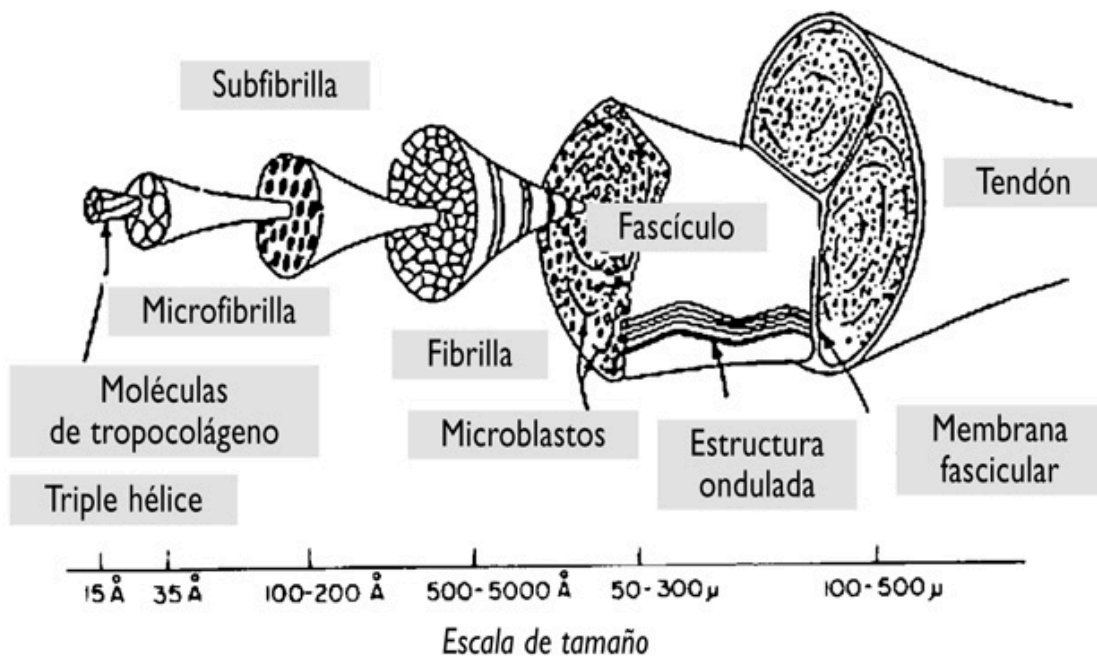


Imagen 12. Ilustración que muestra la estructura del tendón⁹³.

(Kastelic J, Galeski A, Baer E: The multicomposite structure of tendón. *Connect Tissue Res* 1978; 6(1):11-23).

El colágeno tipo I constituye aproximadamente el 60% de la masa del tejido y aproximadamente el 95% del colágeno total^{94,95}. Las fibrillas están compuestas por distintos tipos de colágeno, proteoglucanos y glucoproteínas. El colágeno tipo III es el más abundante en el tendón después del colágeno tipo I, en el tendón supraespinoso humano se sitúa en torno al 3%³⁹. En los tendones sanos, el colágeno tipo III tiende a estar restringido al endotenon y al epitenon, sólo aparece dentro de la masa tendinosa en tendones envejecidos o en el sitio de inserción de tendones sometidos a mucho estrés⁹⁶. El colágeno tipo III produce fibrillas más pequeñas y menos organizadas, lo que determina una disminución de la resistencia global del tendón⁹⁷.

b) Estructura de la entesis

Los tendones del manguito rotador se insertan en la cabeza humeral mediante un tejido fibrocartilaginoso llamado entesis. La inserción del tendón en el hueso es una zona compleja que une 2 tejidos muy distintos. La propia estructura y composición de la entesis del tendón amortigua el estrés de la carga. Aunque los cambios tisulares son progresivos, la entesis se puede dividir en cuatro zonas⁹⁸⁻¹⁰²:

1. La primera zona es la zona del tendón. Contiene fibras bien alineadas de colágeno tipo I con pequeñas cantidades de proteoglucanos, decorina y biglicano.
2. La zona de fibrocartílago no mineralizado. Contiene colágeno tipo II y III con pequeñas cantidades de tipo I, IX, y X y pequeñas cantidades de agrecanos y decorina. Marca la transición entre el tendón y el hueso.
3. La zona de fibrocartílago mineralizado. Predomina el colágeno tipo II y también una alta proporción de colágeno tipo X.

4. La cuarta zona es el hueso donde predomina el colágeno tipo I con alto contenido mineral (calcificado).

El frente de calcificación o “tidemark” se encuentra entre las dos capas de fibrocartílago. En la estructura de la entesis del tendón supraespinoso cabe destacar la presencia de células parecidas a condrocitos productores de colágeno tipo II, que intervienen en la función biomecánica. Por tanto, existe en la zona de la entesis una matriz extracelular parecida al cartílago, la cual está preparada para transferir grandes fuerzas compresivas en dirección a la cabeza humeral^{101,103,104}

c) Biomecánica tendinosa

Los tendones transmiten fuerza desde el músculo al hueso y actúan de amortiguador absorbiendo las fuerzas externas para limitar el potencial daño muscular. Los tendones tienen una gran fuerza mecánica, buena flexibilidad y un nivel óptimo de elasticidad para desempeñar su función. Los tendones son tejidos viscoelásticos con propiedades de relajación y fluencia. La relajación es la disminución de la tensión en un material sometido a una deformación constante, mientras que la fluencia es el aumento gradual de la deformación en un material sometido a una carga constante¹⁰⁵

En el estudio de los materiales viscoelásticos se emplean curvas de tensión-deformación, en ellas se distinguen 3 fases⁹³:

1. La zona de base “*toe region*” es la porción cóncava inicial donde el tendón esta sometido a una tensión menor del 2% de desplazamiento. Durante esta fase la distracción del tendón produce un pequeño aumento de fuerza, esto se debe a que las fibras van adquiriendo una morfología lineal.

2. La zona lineal. A partir del 2% de desplazamiento los tendones se deforman de forma lineal con el aumento de la tensión. Si la tensión permanece menor al 4%, el tendón se comporta de forma elástica y recupera su longitud original cuando cesa la carga. La pendiente de la curva en este punto correspondería con el modulo de Young.
3. Zona de fallo o lesión. A partir del 4% de desplazamiento el tejido pierde su capacidad elástica. El fallo microscópico ocurre cuando la tensión supera el 4%. A partir del 8-10% se observa el fallo macroscópico.

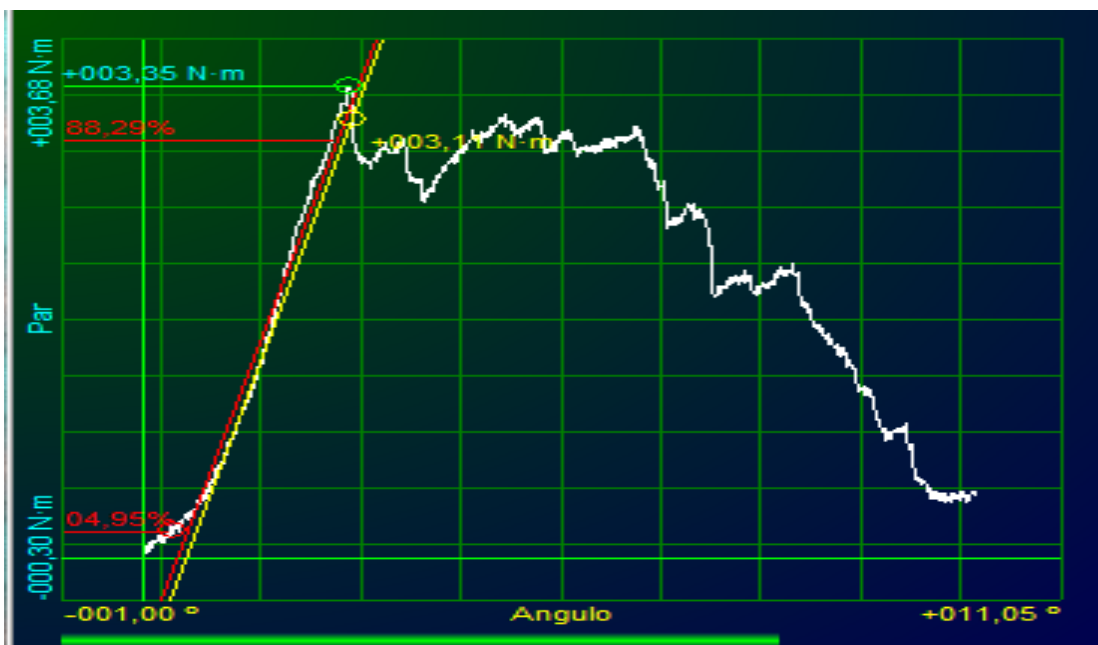


Imagen 13. Ejemplo de curva de tensión-deformación de nuestro estudio. Se aprecia al inicio de la curva la zona de base. Al aumentar la carga la curva forma una recta que corresponde a la zona lineal, cuya pendiente corresponde al modulo de Young. Tras superar la carga máxima del tendón se producen microrroturas en los que la grafica tiene forma de meseta dentada. Finalmente se produce la rotura completa del tejido con la consiguiente caída de la curva.

d) Biología de la reparación de la entesis

La cicatrización tendinosa del manguito rotador ocurre en 3 fases que se solapan: la fase inflamatoria, la fase reparativa y la de remodelado¹⁰⁶. Durante estas fases se produce una compleja interacción entre factores de crecimiento y células que finalmente genera un tejido distinto de la entesis nativa. Cada factor de crecimiento ha demostrado tener, al menos, una función específica en el proceso de la reparación y se expresan de forma temporal durante las diferentes fases⁸. El tendón cicatrizado forma un tejido fibrovascular distinto de las cuatro capas originales, en el que predomina el colágeno tipo III y no está presente el fibrocartílago⁸.

La fase inflamatoria comienza en las primeras 24 horas y clásicamente se ha considerado que dura 7-8 días tras la lesión o la cirugía. Se produce la hemostasis y reclutamiento de células inflamatorias. Se deposita fibrina y fibronectina por las plaquetas del hematoma. Además, las plaquetas liberan citocinas: factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que estimula la infiltración y agregado de macrófagos¹⁰⁷.

En la fase de reparación los macrófagos segregan factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), beta 2 (TGF- β 2) y, en menor medida, beta 3 (TGF- β 3) que estimulan la proliferación de fibroblastos. Los fibroblastos son los encargados de la formación de la matriz extracelular. Producen nuevas citocinas IGF-1, PDGF- β , factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y proteínas morfogenéticas (BMP-12, BMP-13 y BMP-14) y el depósito de colágeno tipo III.

Las proteínas morfogenéticas 12, 13 y 14 se expresan en los fibroblastos activos y son fundamentales en la formación de la nueva interfase. El factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) provoca un aumento en la proliferación de los fibroblastos y suprime la formación de colágeno. Está presente en moderadas cantidades durante todo el proceso, incluyendo la fase de remodelación. El factor de crecimiento insulínico (IGF1) estimula la síntesis de proteínas y la proliferación celular y disminuye el edema tisular. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) está presente en pequeñas cantidades y se relaciona con la presencia del colágeno tipo I.

La fase de remodelado comienza aproximadamente a las 6 semanas con disminución de la celularidad y síntesis de colágeno y glucosamiconglicanos. Esta fase está regulada fundamentalmente por las metaloproteasas (MMP) que modulan el remodelado de colágeno tipo III a tipo I. Esta fase se puede dividir a su vez en fase de consolidación y fase de maduración¹⁰⁸.

- La fase de consolidación comienza aproximadamente a las 6 semanas y continua hasta la décima semana. En este periodo el tejido cambia de celular a fibrótico. El metabolismo de los tenocitos permanece elevado y se alinean los tenocitos con las fibras de colágeno en dirección de las fuerzas de estrés¹⁰⁹. En esta fase se sintetiza una mayor proporción de colágeno tipo I¹¹⁰.

- A partir de la semana 10 hasta el primer año ocurre la fase de maduración con un cambio gradual de tejido fibroso a cicatricial¹¹⁰. Durante la segunda mitad de esta fase disminuye la vascularización y el metabolismo de los tenocitos¹¹¹.

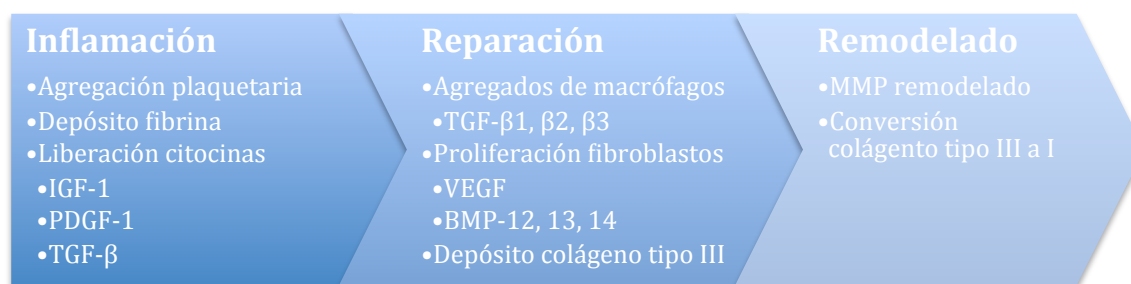


Imagen 14. Ilustración de las 3 fases de la reparación de la entesis. IGF-1: factor de crecimiento insulínico 1, PDGF-1: factor de crecimiento derivado de plaquetas 1, TGF- β : factor de crecimiento transformante beta, VEGF: factor de crecimiento endotelial, BMP: proteínas morfogenéticas, MMP: metaloproteasas.

Las metaloproteasas (MMP) son proteasas dependientes de cinc capaces de degradar las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno y la elastina. Parece que tanto la MMP-2 como el factor tisular inhibidor de metaloproteasas (TIMP-1) son determinantes en la fase de remodelación.

Algunos autores han relacionado la incapacidad para regenerar la entesis nativa con la expresión incompleta y anormal de los genes implicados en su formación durante el periodo embrionario¹¹². Se ha demostrado que la cicatrización fetal de lesiones tendinosas es regenerativa, es decir, forma un tejido idéntico al nativo. Este proceso se caracteriza por niveles bajos de TGF- β 1 y TGF- β 2 y altos de TGF- β 3. Por el contrario, en la vida postnatal se producen una curación con aparición de tejido cicatricial, el cual se caracteriza por niveles altos de TGF- β 1 y TGF- β 2 y bajos de TGF- β 3¹¹³. El papel de las isoformas de TGF- β en el manguito rotador aún no está definido. Galatz y cols.⁸ realizaron un trabajo en el que estudiaban el proceso de cicatrización de una reparación de manguito rotador en ratas y analizaron los procesos biológicos que ocurrían en diferentes puntos del sacrificio. Encontraron que el colágeno tipo I y su correspondiente mRNA se incrementaban

significativamente a los 10 días y alcanzaban un nivel estable entre los 28 y 56 días. El colágeno tipo III se comportaba de manera similar, con una elevación inicial que se mantenía hasta los 56 días. El TGF β -1 presentaba un pico localizado en la zona de formación de la cicatriz a los 10 días, aproximadamente. El TGF β -3 no se encontraba en la zona de la inserción y la densidad de proliferación celular tenía un comportamiento paralelo al TGF β -1.

Desde el punto de vista de aplicación práctica al manguito rotador, numerosos factores exógenos pueden condicionar el proceso de cicatrización. Se ha demostrado que los tratamientos antiinflamatorios pueden tener un efecto negativo en la cicatrización del manguito, al inhibir la cicloxigenasa-283. Thomopoulos y cols.¹¹⁴ estudiaron en un modelo murino de rotura del manguito rotador la relación entre las citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF α) y las antiinflamatorias (IL-4). Parece que en la primera fase se necesita cierta respuesta inflamatoria para iniciar la reparación inmediata. Sin embargo, una vez que se ha iniciado, es esencial el equilibrio entre los fenómenos proinflamatorios y antiinflamatorios. También los corticoides locales en forma de inyección subacromial, son utilizados frecuentemente como tratamiento en la enfermedad degenerativa del manguito rotador⁴⁹. Parece que éstos podrían retrasar la cicatrización mediante la inhibición de la proliferación celular, la disminución de la síntesis de colágeno y la debilitación de sus fibras. Así mismo, parecen aumentar la concentración de colágeno tipo III. Los esteroides anabolizantes pueden alterar la morfología del tendón, favoreciendo su ruptura, pero su papel en la cicatrización aún es controvertido. La presencia de nicotina también es deletérea¹¹⁵. Modelos animales han demostrado que la inmovilización tras la reparación, permite un

mejor proceso de cicatrización. La ausencia de cargas crea un tejido con mejores propiedades viscoelásticas, mayor presencia porcentual de colágeno tipo I frente al colágeno tipo II y un aumento de la expresión de colágeno tipo XII y de agrecanos¹¹⁶.

4) Terapias biológicas para la reparación del manguito rotador

La incapacidad del tendón suturado de cicatrizar formando una estructura similar al tendón nativo ha impulsado el estudio de las terapias biológicas. Existen diversos tipos de terapias que se analizan a continuación:

a) Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento juegan un papel importante en la reparación tendinosa. Se ha demostrado que algunos factores están aumentados durante el proceso de cicatrización del supraespinoso en ratas: BMP-12, BMP-13, BMP-14, PDGF, TGF- β ¹¹⁷. Dado que estos factores están presentes durante el proceso de reparación, la hipótesis es que su adición exógena en la reparación podría estimular el proceso de curación. Sin embargo, no bastaría únicamente con identificar los factores implicados en la cicatrización, sino también el momento en que deben ser incorporados a la reparación para ser efectivos. Estos factores de crecimiento se suelen utilizar junto algún vehículo para evitar la dispersión local. Algunos de esos vehículos utilizados han sido suturas recubiertas, geles de fibrina, esponjas de colágeno u otros tejidos diseñados para servir como andamiaje para la reparación¹¹⁸⁻¹²⁰.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

El PDGF proviene de las plaquetas y de las células musculares lisas, su

concentración máxima se produce entre el séptimo y decimocuarto día tras la lesión tendinosa, al final de la fase inflamatoria e inicio de la reparativa¹²¹. El PDGF esta compuesto por 2 subunidades (A y B) y existe en 3 isoformas (AA, BB y AB). En la entesis, PDGF-BB estimula la migración y división celular y la producción de colágeno tipo I y TGF- β 1^{121,122}. Ugmen y cols.¹²³ observaron una recuperación de la morfología normal del colágeno, aplicando PDGF-BB en modelo murino de manguito rotador. Sin embargo, otros estudios no han demostrado un aumento de la fuerza del tendón reparado

Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β)

El TGF- β es una familia de citoquinas que parece jugar un importante papel en la cicatrización tendinosa al estimular la proliferación celular, diferenciación y síntesis de la matriz extracelular¹²¹. Hay 3 isoformas en la familia: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. De todas ellas la más estudiada actualmente es la isoforma TGF- β 3. Su expresión esta elevada durante el desarrollo prenatal, periodo en el cual la cicatrización de lesiones tendinosas forma un tejido idéntico a la entesis nativa. Sin embargo, en la vida postnatal la curación se produce a través de la aparición de tejido cicatricial y los niveles de TGF- β 3 están disminuidos^{124,125}.

Kovasevic y cols.¹¹⁹ obtuvieron un incremento significativo en la fuerza del manguito al mes postoperatorio y una mejoría en la relación colágeno I/III al aplicar TGF- β 3 en un tendón supraespinoso de rata.

Proteínas morfogenéticas (BMP)

BMP son un grupo de factores dentro de la superfamilia del TGF- β que intervienen en la formación de hueso, tendón y cartílago. BMP-12, BMP-13 y BMP-14 se han relacionado con la formación de tendón en el manguito rotador^{126,127}. Seeherman y

cols.¹²⁸ investigaron la aplicación de BMP-12 en el manguito rotador de oveja. Los investigadores describieron un aumento de glicosaminoglicanos y una mejoría de la continuidad de las fibras de colágeno en la unión tendón-hueso, en comparación con un grupo control. En un estudio más reciente, Gulotta y cols.¹²⁹ evaluaron el uso de células madre derivadas de médula ósea, modificadas para producir BMP-13 en manguito rotador de rata. A diferencia de otros trabajos, no hallaron diferencias en la formación de colágeno, composición de la matriz o propiedades mecánicas respecto a un grupo control.

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Los FGF son una familia de 23 polipéptidos y su función principal es la reparación tendinosa. Promueven la angiogénesis estimulando la división celular de las células endoteliales capilares y las células mesenquimales. De las 23 isoformas, FGF-1 y FGF-2 se han identificado como las más importantes en el tejido adulto^{121,130}. Su pico de concentración aparece a los 7-9 días de la lesión¹³¹.

Ide y cols.¹³⁰ aplicaron FGF y un sellante de fibrina al manguito reparado en ratas, con un aumento estadísticamente significativo de la resistencia mecánica y en las escalas histológicas a las 2 semanas postoperatorias. Sin embargo, los resultados se igualaban a los controles a las 4 y 6 semanas.

Otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento insulínico, han mostrado resultados prometedores en tendón de Aquiles¹³² y flexores¹³³. Sin embargo, aún no existen estudios en manguito rotador.

b) Inhibidores de las metaloproteasas

Las metaloproteasas (MMP) son proteasas dependientes de cinc cuya función, de forma colectiva, es mantener y remodelar la matriz extracelular de los tejidos conectivos. Las metaloproteasas que más se han relacionado con la patología del manguito rotador son MMP-1, MMP-8 y MMP-13. Una actividad excesiva de las MMP puede llegar a provocar debilidad progresiva en la matriz extracelular de la que dependen los tendones. Normalmente, la actividad de las metaloproteasas está disminuida por los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP). Éstos son inhibidores endógenos que permiten regular el complejo equilibrio entre el proceso reparativo y el degenerativo, manteniendo la homeostasis de la matriz extracelular. Sin embargo, en determinadas situaciones puede existir una alteración en la expresión de estas proteínas y sus inhibidores. Algunos estudios han relacionado estas enzimas con el crecimiento tumoral, la enfermedad aneurismática vascular y la remodelación tisular que ocurre tras la cirugía, incluyendo el modelo de manguito rotador pre y postquirúrgico^{134,135}. Castagna y cols.¹³⁶ demostraron en un estudio en manguito rotador humano que la concentración de MMP y de TIMP estaba alterada tanto en las zonas de rotura del manguito como en zonas sanas. Lo y cols.¹³⁷ encontraron niveles elevados de ARN del MMP-13 y disminuidos de TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 en pacientes con roturas completas del manguito rotador.

En cuanto a su aplicación clínica, numerosos grupos de investigación han publicado sus resultados tanto en modelos de manguito rotador como en otras tendinopatías. Bedi y cols.¹³⁸ realizaron un estudio experimental de reparación de manguito rotador en ratas, en el que administraban doxiciclina oral a dosis altas

tras la cirugía para provocar una inhibición de la MMP-13. En el análisis de las muestras se observó una mayor cantidad de fibrocartílagos, una mejor organización del colágeno y una mayor resistencia de la entesis a las 2 semanas. Se ha visto que las tetraciclinas inhiben de forma global la actividad de las MMP y su administración local o sistémica es capaz de disminuir la degeneración del hueso, cartílago o tendón asociado a un exceso de estas enzimas.

A pesar de los buenos resultados preliminares, aún no se ha establecido si la inhibición no selectiva de las MMP también podría impedir la remodelación tendinosa que ocurre durante la última fase del proceso de curación. Serán necesarios más estudios para su mejor comprensión.

c) Terapia génica

La expresión de los factores de crecimiento cuando se aplican localmente es efímera y esto limita la utilidad que pudiera tener en la reparación del manguito rotador. La terapia génica se basa en modificar las células de forma que expresen de forma continua genes que produzcan esos factores de crecimiento deseados¹²⁹. La terapia génica *in vivo* utiliza virus recombinantes o plásmidos de ADN que codifican esos factores de crecimiento. Mientras que la terapia génica *ex vivo* consiste en modificar genéticamente células para que expresen la información deseada y después reintroducirlas en el lugar de la lesión. Así, en el manguito rotador, consiste en cultivar y expandir células autólogas transducidas con virus. También se ha descrito la utilización de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) con este fin para evitar los posibles riesgos de la terapia viral¹³⁹. Estas técnicas aún no han tenido aplicación en seres humanos.

d) Matrices extracelulares

Para mejorar los problemas de rechazo de los injertos tisulares se desarrollaron las matrices extracelulares que pueden ser, según su origen: xenogénicas, alogénicas o sintéticas. Sirven como puente entre ambas estructuras y permiten un crecimiento celular alineado y una mejor disposición de las fibras de colágeno. Se utilizaron inicialmente en estudios animales¹⁴⁰⁻¹⁴² y recientemente algunas de estas matrices han sido aprobadas para su uso en seres humanos¹⁴³. Existen muchos productos comerciales cuya utilización ha sido controvertida. De ellos, el que tiene un uso más extendido y ha sido mejor estudiado en modelos de roturas del manguito rotador es una matriz alogénica denominada GraftJacket® que se obtiene a partir de dermis humana. En un estudio clínico en pacientes con roturas masivas del manguito rotador, Bond y cols.¹⁴⁴ encontraron una tasa de fracaso de la reparación del 19% frente al 38-95% que habían obtenido en otras series de roturas con las mismas características. La mayor parte de los estudios que han sido realizados en humanos son de nivel IV de evidencia científica, por lo que aún son necesarios ensayos clínicos aleatorizados que confirmen estos resultados. De hecho, Iannotti y cols.¹⁴⁵, en un estudio prospectivo aleatorizado en roturas masivas del manguito rotador, no encontraron diferencias significativas en los resultados clínicos ni en el índice de cicatrización utilizando submucosa porcina intestinal. Debido a un defecto en el procesado del parche observaron numerosas reacciones inflamatorias que les obligó a cancelar el estudio.

e) Componentes celulares

Se basan en el aporte de una estructura que favorezca la cicatrización en un tendón previamente degenerado. Los injertos tendinosos tienen como función disminuir la

tensión entre el hueso y el tendón, pero también pueden favorecer el proceso de reparación biológico mediante el aporte de células y factores de crecimiento o al servir como andamiaje para la reparación¹⁴⁶. Moore y cols.¹⁴⁷ utilizaron injerto alogénico de cadáver en 28 pacientes con roturas masivas del manguito rotador, sin demostrar mejores resultados que el desbridamiento y acromioplastia de forma aislada. Hubo dos complicaciones, una infección y un rechazo agudo del injerto. Cho y cols.¹⁴⁸ describieron la utilización de autoinjerto de tendón del bíceps obtenido en el mismo procedimiento quirúrgico mediante tenotomía. Demostraron mayor fuerza y menor tasa de fracaso estructural comprobado mediante resonancia magnética a los 12 meses postoperatorios.

f) Plasma rico en plaquetas

i) Definición de plasma rico en plaquetas

El plasma rico en plaquetas (PRP) se define como sangre autóloga con una concentración de plaquetas por encima de los niveles basales normales. Las plaquetas tienen un importante papel en la respuesta de cicatrización normal a través de la liberación de factores de crecimiento y el reclutamiento celular¹⁴⁹. Los factores de crecimiento PDGF, TGF, FGF, VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) son considerados clásicamente los responsables de los efectos beneficiosos del PRP. Son liberados de los gránulos alfa, gránulos densos y lisosomas tras la activación de las plaquetas. Sin embargo, recientes estudios han identificado nuevas moléculas contenidas en los gránulos alfa cuya función aún no se conoce¹⁵⁰.

ii) Preparaciones de plasma rico en plaquetas

La preparación de PRP comienza con la obtención de una muestra de sangre.

Mediante centrifugación o filtrado se divide en plaquetas, hematíes y leucocitos. En el caso de la centrifugación, la sangre se divide en 3 capas claramente diferenciadas: en la parte superior se encuentra el plasma acelular (PPP: “platelet poor plasma”), en medio aparece la capa nucleada o “buffy coat” donde se concentran las plaquetas y los leucocitos. Por último en la base se concentran los hematíes.

Los métodos que emplean la capa “buffy coat”, son los que mayor concentración de plaquetas obtienen, a cambio de obtenerlas junto con leucocitos. Los sistemas que recogen la capa de plasma junto a la “buffy coat”, tienen una concentración de plaquetas menor pero la cantidad de leucocitos es mínima.



Imagen 15. Muestra de tubo de sangre centrifugada. Se puede observar en la parte superior el plasma acelular, en la capa inferior hematíes depositados y entre ambas la capa nucleada o “buffy coat”, donde se encuentra la mayor concentración de plaquetas y leucocitos.

Existe mucho debate sobre la concentración óptima de plaquetas en el PRP. Delong y cols.¹⁵¹ clasificaron el PRP en función de la concentración de plaquetas:

- Baja (basal o menor): en teoría esta concentración no produciría una respuesta celular suficiente. Se usa únicamente como control en estudios.
- Moderada (hasta 4 veces la basal): hasta 750.000 plaquetas por microlitro. Existen numerosas publicaciones que han demostrado su eficacia. Sanchez y cols.¹⁵² inyectaron PRP activado con una concentración 3 veces la basal en tendones de Aquiles tras reparación quirúrgica, con resultados estadísticamente significativos a favor del PRP. Otros autores han publicado resultados similares con estas concentraciones de plaquetas^{149,153}.
- Elevada (entre 4 y 6 veces la basal): entre 750.000 y 1.800.000 plaquetas por microlitro. Existen también numerosos estudios que publican resultados favorables con estas concentraciones. He y cols¹⁵⁴. demostraron una consolidación ósea acelerada usando PRP con concentraciones de plaquetas entre 4 y 5 veces la basal. También estudiando la consolidación ósea, Weilbrich y cols.¹⁵⁵ emplearon una concentración de plaquetas 6 veces la basal con resultados estadísticamente significativos.
- Súper (mayor de 6 veces la basal): mayor de 1.800.000 plaquetas por microlitro. Se ha visto que las concentraciones demasiado elevadas producen un efecto inhibitorio paradójico¹⁵⁵.

En la actualidad existen varios sistemas de preparación de PRP. Con el mismo nombre se presentan preparados con muy distintas composiciones. Éstos varían en la concentración de PRP, en la presencia o ausencia de leucocitos, factor activador y momento de la activación.

En base a los anteriores parámetros, Dohan Enrengest y cols.^{156,157} elaboraron una clasificación que divide el PRP en 4 categorías principales:

- Plasma rico en plaquetas puro (P-PRP): contiene únicamente concentrado de plaquetas sin leucocitos. Dentro de este apartado tendríamos:
 - Procedimientos automáticos: existen fundamentalmente 2 métodos: plasmaféresis y centrifugación vivostat PRF (Vivolution, Dinamarca). Ambos poco empleados debido a su dificultad y elevado precio.
 - Procedimientos manuales: uno de los primeros concentrados de plaquetas fue descrito en 1999 por Anitua y comercializado por BTI (BioTechnology Institute, Vitoria, España). Para su preparación se extrae sangre venosa periférica y se anticoagula con citrato sódico. Posteriormente es centrifugada a baja velocidad para dividir la sangre en las 3 capas ya mencionadas. Mediante pipeteado se extrae y desecha la capa superior de plasma, el cual se denomina plasma pobre en factores de crecimiento (PPGF). Se selecciona la porción del plasma más cercana a la “buffy coat”, denominada plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). La activación del PRGF se realiza añadiendo cloruro cálcico. Este método obtiene una concentración moderada de plaquetas sin leucocitos.

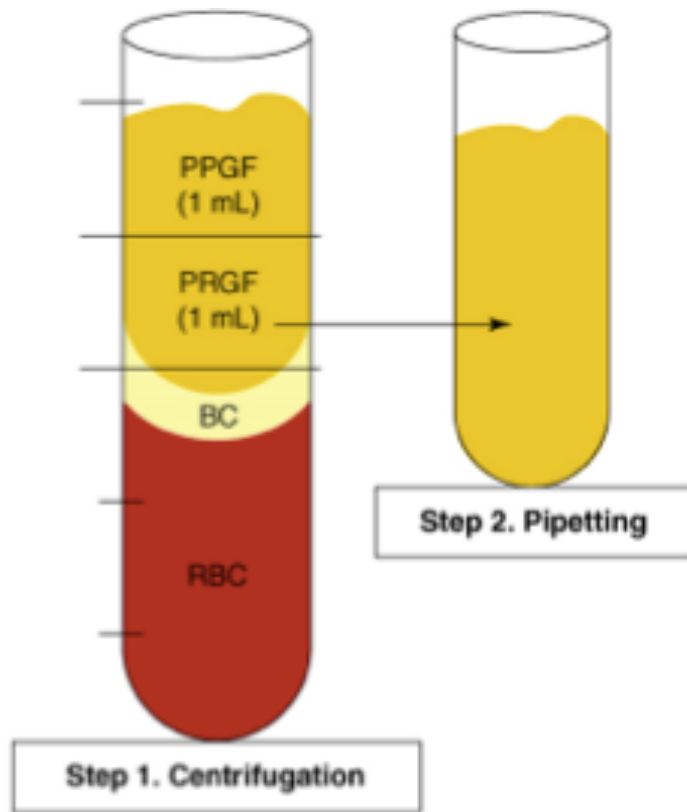


Imagen 16. Esquema que describe el protocolo de Anitua para la obtención de PRP. Mediante centrifugación la sangre se divide en 3 capas: glóbulos rojos en la base, capa "buffy coat" en medio y en la superficie el plasma acelular. Este se puede dividir en plasma pobre en factores de crecimiento (PPGF) y plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) que es el que se encuentra encima de la "buffy coat". Mediante pipeteado se recoge únicamente la porción de plasma rico en plaquetas. PPGF: plasma pobre en factores de crecimiento, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, BC: "buffy coat", RCB: glóbulos rojos¹⁵⁶.

(Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends Biotechnol 2009 Mar;27(3):158-167).

- Plasma rico en plaquetas con leucocitos (L-PRP): contiene plaquetas y leucocitos concentrados.
 - Procedimientos manuales: Comercializados por Curasan (Kleinostheim, Alemania), Friadent-Schütze (Vienna, Austria), Plateltex (Bratislava, Eslovaquia) y Regen PRP (Regen Laboratory, Mollens, Suiza). Emplean un sistema de centrifugación en dos fases que obtiene un PRP con una alta concentración de plaquetas, leucocitos y fibrinógeno. También contiene

glóbulos rojos residuales. Su activación se realiza mediante trombina bovina y cloruro cálcico.

- Procedimientos automáticos: comercializados como SmartPReP (Harvest Corp, Plymouth, EEUU), Magellan APS (Medtronic, Minneapolis, EEUU), GPS (Gravitational Separation System, Biomet Biologic, Warsaw, EEUU). De forma similar emplean un centrifugado en 2 fases pero la selección de los componentes se realiza de forma automática, según el peso de los componentes, la velocidad de centrifugación o un lector óptico. Su principal inconveniente es su elevado coste y dificultad, por lo que su uso es poco frecuente.
- Gel o fibrina rico en plaquetas (P-PRF): sólo existe un método disponible en el mercado para su obtención: Fibrinet PRFM (Cascade Medical, New Jersey, EEUU). Una muestra de sangre es anticoagulada con citrato sódico que se mezcla con un gel separador y es centrifugada. Las porciones de PPP y “buffy coat” se transfieren a otro tubo donde se activan mediante cloruro cálcico. Inmediatamente se vuelve a centrifugar, obteniéndose un coágulo rico en plaquetas. Este método obtiene una alta concentración de plaquetas bien preservadas con una baja concentración de leucocitos, gracias al gel separador. Su desventaja es la dificultad para procesar varias muestras simultáneamente y su elevado coste. Además, no existen estudios que demuestren la eficacia de este método.
- Gel o fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF): este método se desarrolló en Francia por Choukroun y cols¹⁵⁸. Una muestra de sangre venosa es centrifugada sin adición de anticoagulantes a baja velocidad. De esta forma la formación del coágulo se produce inmediatamente. Tras la centrifugación se

forman las tres capas: glóbulos rojos en la base, plasma acelular en la superficie y un coágulo rico en plaquetas y leucocitos en el medio. Este coágulo forma una fuerte matriz de fibrina que se disuelve lentamente de forma similar a un coágulo de sangre natural. Al ser activadas las plaquetas, la mayoría de los factores de crecimiento quedan embebidos en la matriz de fibrina. Es un método barato que permite la producción rápida de muchos concentrados.

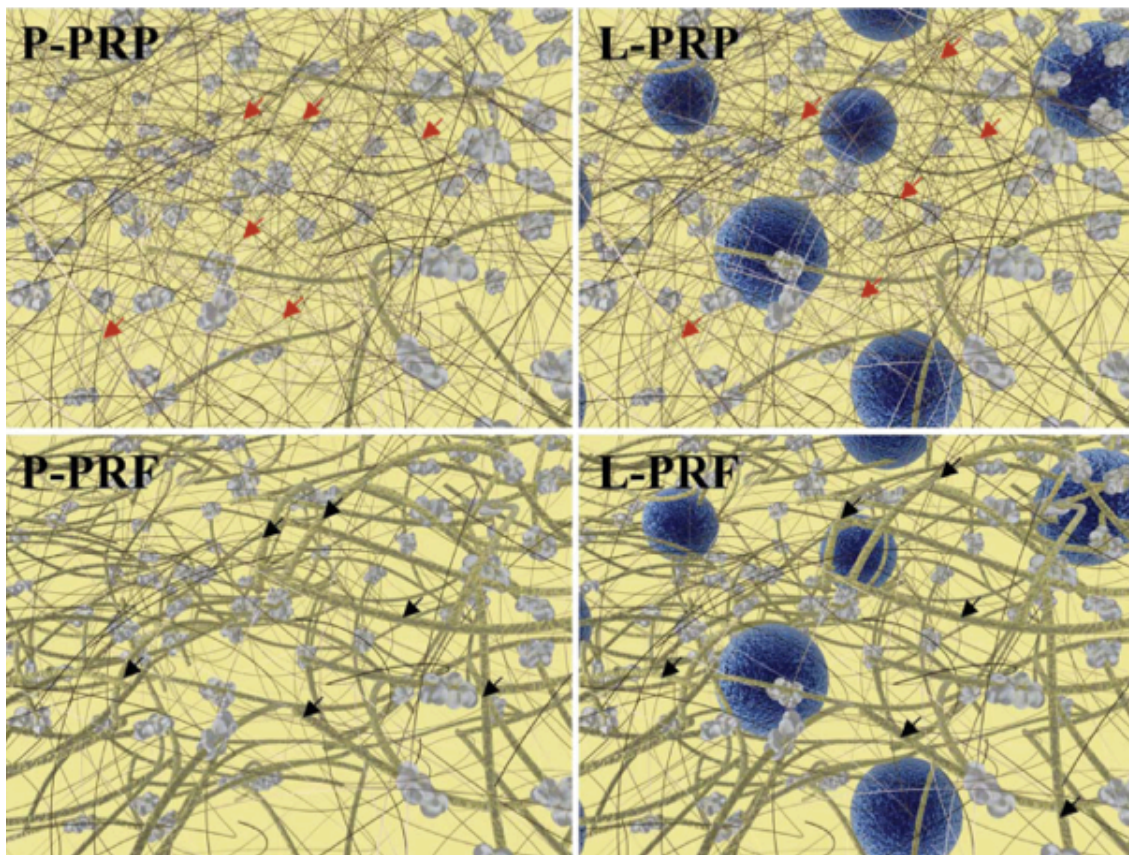


Imagen 17. Ilustraciones que muestran de forma esquemática la matriz y arquitectura celular de las 4 tipos de preparados de concentrados plaquetarios. Los 2 parámetros más importantes son la presencia de leucocitos (círculos azules) y la densidad de las fibras de fibrina (fibras marrones). Las plaquetas (formas redondeadas grises) siempre se encuentran agregadas con las fibras. En las 2 imágenes superiores, P-PRP (plasma rico en plaquetas puro) y L-PRP (plasma rico en leucocitos), el entramado de fibrina es menos denso (flechas rojas), disolviéndose pronto tras la aplicación. En las 2 imágenes inferiores, P-PRF (gel o fibrina rica en plaquetas) y L-PRF (gel o fibrina rica en leucocitos y plaquetas), el entramado de fibrina es más denso (flechas negras), disolviéndose más lentamente¹⁵⁶.

(Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends Biotechnol 2009 Mar;27(3):158-167).

El PRP se puede administrar con o sin un factor activador. Los 2 factores activadores más frecuentes son el cloruro cálcico y la trombina, los cuales precipitan la activación de las plaquetas, la formación del coágulo y la liberación de los factores de crecimiento. Su ventaja es la formación de un coágulo más fácil de manejar y depositar en el lugar deseado¹⁵². La inyección sin factor activador es bastante frecuente y se basa en la activación de las plaquetas al entrar en contacto con las fibras de colágeno¹⁵⁹.

Dada la naturaleza autóloga del PRP, sus posibles efectos adversos son mínimos. Contraindicaciones relativas serían: pacientes con antecedentes de trombocitopenia, tratamiento anticoagulante, infección activa, tumores y embarazo. No ha habido casos documentados de carcinogénesis, hiperplasia o crecimiento tumoral asociados al uso de PRP¹⁶⁰.

iii) Aplicación clínica del plasma rico en plaquetas

El uso de las plaquetas como vehículo para la administración de factores de crecimiento se inició a finales de los años noventa en cirugía plástica y maxilofacial. Se comenzó a utilizar debido a sus propiedades adhesivas y hemostáticas, sustituyendo a los pegamentos de fibrina. Debido a la observación de sus propiedades antiinflamatorias y formadoras de hueso, se iniciaron los primeros estudios clínicos¹⁶¹. Su uso en cirugía ortopédica se inició a comienzos del 2000, con el uso en injertos óseos y consolidación de fracturas.

Dentro de las posibles funciones del PRP se encuentran: actuar como “pegamento” biológico, favorecer la coagulación y la hemostasia, favorecer la cicatrización de las heridas, restaurar el ácido hialurónico intraarticular, equilibrar la angiogénesis

articular, aumentar la síntesis de glucosaminoglucanos y matriz cartilaginosa y servir como soporte celular en la migración y diferenciación¹⁶². Además, son conocidas sus funciones analgésicas, antibacterianas y antiinflamatorias.

En cuanto al aparato locomotor, se ha aplicado en patologías crónicas como la epicondilitis lateral, la tendinitis rotuliana, tendinitis aquilea y en patologías agudas como roturas del tendón de Aquiles o roturas musculares con resultados variables¹⁶³. Parece que también podría tener un efecto beneficioso en los defectos osteocondrales, en la osteocondritis disecante o en las reconstrucciones de ligamento cruzado en la rodilla¹⁶². Su uso más extendido ha sido en la epicondilitis, con resultados aparentemente esperanzadores¹⁶⁴. Sin embargo, en un metaanálisis de Ahmad y cols.¹⁶⁵, a pesar de apreciarse aparente beneficio a favor del uso de PRP frente a corticoides, los autores recomiendan estudios a mayor largo plazo y con mayor homogeneidad en el método de preparación.

Todavía existe controversia en cuanto al uso de PRP, la última revisión de la Cochrane afirma que no existe evidencia científica suficiente para recomendar su utilización en ninguna de las mencionadas patologías, incluyendo el manguito rotador¹⁶³. Por otro lado, Sheth y cols.¹⁶⁶ en un metaanálisis consideraron que existe una falta de estandarización de los protocolos y los preparados de PRP, por lo que los resultados aún son inciertos.

iv) Plasma rico en plaquetas y manguito rotador

En estudios in vitro se ha demostrado buenos resultados con el uso de PRP. Hoppe y cols.¹⁶⁷ demostraron una mayor proliferación y síntesis de matriz extracelular en un cultivo enriquecido con PRP de tenocitos procedentes de roturas crónicas de

manguito en humanos. Resultados similares fueron descritos por Jo y cols.¹⁶⁸ usando células precursoras de tenocitos.

A pesar de los buenos resultados in vitro, los estudios clínicos en manguito rotador tienen resultados variables. Antuña y cols.¹⁶⁹, en un estudio realizado en roturas masivas del manguito rotador no encontraron diferencias clínicas ni disminución en el número de rerroturas. Otro grupo español, Ruiz-Moneo y cols.¹⁷⁰, en un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego, tampoco encontraron ventajas en la reparación del manguito rotador tras la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento plaquetarios. Sin embargo, otros autores defienden la utilización de PRP en casos seleccionados. Sánchez y cols., grupo con amplia experiencia en la utilización de PRP, atribuyen el fracaso del grupo anterior a la deficiente preparación de la infiltración¹⁷¹. Randelli y cols.¹⁷², en un estudio prospectivo y aleatorizado aplicaron tras la reparación quirúrgica PRP en roturas no masivas, encontrando menor dolor postoperatorio y una aceleración en el proceso de cicatrización en los pacientes del grupo con PRP. Sin embargo, no hubo diferencias en las escalas funcionales al año y a los dos años de seguimiento ni en la tasa de rerrotura, que fue del 14 % frente al 37% en el grupo control. Por el contrario, Gumina y cols.¹⁷³, en un estudio en el que aplicaban una membrana leucocitaria de PRP en la huella anatómica, encontraron menor índice de rerroturas y mejores características de la cicatrización, sin que este hecho suponga una mejor función y movilidad del hombro. Rodeo y cols.¹⁷⁴ en un estudio aleatorizado de roturas de espesor completo de manguito, aplicaron una membrana de fibrina impregnada en PRP (PRFM, Selphyl) entre el tendón y la huella anatómica durante la reparación y revisaron los pacientes al año de seguimiento. Los autores no encontraron ningún

beneficio en el grupo de PRP. Además, encontraron una tasa de rerroturas más elevada en el grupo de PRP (33% frente a 29%).

En un reciente metaanálisis, los autores no hallaron evidencia para recomendar la adicción de PRP a reparaciones artroscópicas de roturas de espesor completo del manguito rotador, debido a sus similares resultados en escalas funcionales y tasa de rerroturas¹⁷⁵.

g) Terapia celular

i) Definición de célula troncal

Se considera célula troncal aquella célula indiferenciada que posee dos características: capacidad de autorregeneración y capacidad para formar células maduras diferenciadas de diferentes estirpes celulares¹⁷⁶. Son células con capacidad de división tanto simétrica como asimétrica, es decir, bien producen dos copias exactas de sí mismas o bien producen una copia exacta de sí mismas y otra célula con capacidad de realizar una función más especializada¹⁷⁷. Se clasifican en función de su potencialidad:

a) Células troncales totipotenciales: son las células madre más indiferenciadas, capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario. Sólo se encuentran en el cigoto y su evolución hasta mórula.

b) Células troncales pluripotenciales: son capaces de diferenciarse en células de cualquier tejido del organismo adulto que se origine en las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo. No son capaces de diferenciarse en células germinales. Se encuentran principalmente en la

masa interna del blastocisto.

c) Células troncales multipotenciales: pueden diferenciarse únicamente en células de su misma capa embrionaria. Se están encontrando en todos los tejidos adultos, destacando la médula ósea, la sangre y la fracción estromal del tejido adiposo.

d) Células unipotenciales: pueden dividirse únicamente a células idénticas a ellas mismas.

Las células troncales adultas se encuentran en los diferentes tejidos del organismo adulto formando pequeños nichos. Aunque inicialmente se pensaba que eran células multipotenciales, estudios posteriores demostraron que algunas de ellas tienen la capacidad de diferenciarse en células mesodérmicas, endodérmicas y ectodérmicas, al menos *in vitro*. Hoy en día se acepta la existencia de células que cumplen ambas premisas en casi todos o todos los órganos de los individuos adultos. La función de estas células parece estar relacionada con la renovación de las células que mueren en los tejidos adultos; así como, con la reparación de pequeñas lesiones que se producen constantemente en los órganos adultos¹⁷⁸.

ii) Definición de terapia celular

Podemos definir la terapia celular como la administración de productos biológicos que contengan células para el tratamiento de enfermedades o para servir de apoyo a otras terapias.

Gimble y cols.¹⁷⁶ definieron que para que un tipo de célula troncal pueda ser utilizado en medicina regenerativa ésta debe cumplir una serie de condiciones:

1. Estar presente en cantidad abundante (millones o billones de células).
2. La obtención se realice mediante un procedimiento mínimamente invasivo.
3. Su diferenciación a otras líneas celulares sea un proceso regulable y reproducible.
4. Puedan ser trasplantadas a un huésped autólogo o alogénico de una forma segura.
5. Su proceso de manufactura cumpla con la legislación internacional al respecto.

Dentro del grupo de células progenitoras que cumplen los criterios expuestos anteriormente, las más utilizadas en estudios experimentales y clínicos son las células troncales mesenquimales y, principalmente, las procedentes del estroma de médula ósea^{177,179}. El sistema hematopoyético del hueso es un órgano altamente proliferativo que contiene células madre hematopoyéticas pero también células madre no hematopoyéticas en el estroma. Estas últimas constituyen un grupo denominado células madre mesenquimales (MSC) o células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC). Las células mesenquimales fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1976 a partir de extractos de médula ósea adulta; las describió como unas células que se adherían al plástico, capaces de ser cultivadas durante tiempo indefinido sin modificar su fenotipo y que se podían diferenciar en células de tejidos mesodérmicos como hueso, cartílago, músculo, tendón, grasa y estroma medular¹⁸⁰. Después, numerosos autores han comprobado que, al menos *in vitro* se pueden diferenciar a células de tejidos derivados de otras láminas embrionarias, presentando marcadores y morfología típica de

cardiomioblastos, neuronas o astrocitos e incluso células hepáticas¹⁸¹. Se ha demostrado también que migran hacia los tejidos periféricos y contribuyen a la reparación tisular. Por ello, pueden obtenerse de sangre periférica mediante un proceso de aféresis.

El término célula madre mesenquimal o célula troncal mesenquimal hace referencia, por tanto, al tipo de célula que tiene la capacidad de proliferar y diferenciarse en progenitores de los diferentes tejidos del mesodermo¹⁷⁷. Sin embargo, para que una de estas células sea considerada progenitora, durante su cultivo in vitro debe cumplir tres requisitos. El primero de ellos es la capacidad de autorrenovación asimétrica, es decir, cuando una célula progenitora mesenquimal se divide, al menos una de las células resultantes debe ser idéntica a la célula de la que procede, si bien en algunos casos ambas células hijas son idénticas a la célula de origen. El segundo de ellos es la capacidad de diferenciarse a células de distintas estirpes mesoteliales (osteocito, condrocito, adipocito) y, por último, la existencia de los siguientes marcadores de membrana: CD9, CD29, CD44, CD51, CD59, CD90, CD105, HLA 1, D7-FIB, y la ausencia de: CD34, CD133, HLA-DR (138). Al carecer de expresión molecular del complejo mayor de histocompatibilidad II y tener muy limitada la expresión del I son hipoinmunogénicas, lo cual permite su uso alogénico.

El mecanismo exacto por el que estas células troncales tienen la capacidad potencial de diferenciación no es del todo conocido aunque parece que podría ser debido al proceso conocido como transdiferenciación. Existen dos teorías para explicar este fenómeno:

- Teoría de la fusión entre las células troncales adultas y células del ambiente en el que se encuentran¹⁸². Cuando se cultivan células troncales adultas con células troncales embrionarias, algunas de ellas se fusionan y de la misma manera, cuando se cultivan con células del receptor, se fusionan con ellas, apareciendo nuevas células con una mezcla del citoplasma de ambas.
- Teoría que defiende que es el microambiente en el que se encuentran las células el que promueve la diferenciación a una determinada estirpe celular¹⁸³. Este concepto se basa en el proceso de la hematopoyesis, en el que la proliferación y diferenciación de las células progenitoras depende de factores secretados por las células presentes en el medio.

Durante la última década se han encontrado células similares a las BM-MSC en otros órganos adultos como el tejido adiposo, en la pulpa dental, en la sangre del cordón umbilical, en tejidos fetales, tejido placentario, líquido amniótico, tejido sinovial, músculo o tendón entre otros¹⁸⁴. Las más utilizadas, junto con las del origen de la médula ósea, son las células troncales mesenquimales derivadas del tejido graso, que serán tratadas ampliamente a continuación, pero también otras estirpes celulares han comenzado a utilizarse en diferentes estudios experimentales.

iii) Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo

En 1964 Rodbell y cols.¹⁸⁵ describieron por primera vez el método para aislar las células del tejido adiposo. El tejido graso procedente de rata se lavaba para eliminar las células hematopoyéticas, se incubaba con colagenasa tipo I en

pequeños fragmentos y después de la digestión, se centrifugaba. Entonces se separaba la población flotante de células grasas maduras de la porción estromal vascular sedimentada (SVF). Este sedimento estaba formado por una población celular heterogénea que incluía células circulantes sanguíneas, fibroblastos, pericitos, células endoteliales y lo que se denominó “pre-adipocitos o progenitores de los adipocitos”. En el año 2001, el grupo de P. Zuk¹⁸⁶ realizó este proceso con tejido procedente de una liposucción y fue la primera vez que se habló de células troncales mesenquimales pluripotentes. Este proceso fue modificado posteriormente por varios grupos de investigación hasta que estos pre-adipocitos fueron caracterizados como células madre mesenquimales. Las fases del mismo serían: aislamiento, cultivo y expansión¹⁸⁷.

La nomenclatura para referirse al producto de la digestión del tejido adiposo mediante colagenasa es amplia. En la literatura pueden aparecer citados los siguientes nombres: células estromales derivadas de la grasa, células madre derivadas de la grasa, células adiposas estromales, células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo, lipoblastos o pre-adipocitos¹⁸⁸. El término aceptado internacionalmente y recomendado por la *Sociedad internacional de Terapia Celular (ISCT)* y la *Federación Internacional de Ciencia y Terapia con tejido adiposo (IFATS)* es el de Células Troncales Mesenquimales Derivadas del Tejido Adiposo (CMDL). En este trabajo se empleará esta abreviatura. En inglés, ASC “Adipose Stem Cells”¹⁸⁹.

El perfil de marcadores celulares de membrana es similar al de las MSC de médula ósea, ambas células expresan CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105/SH2 y SH3, que junto con SH2 se considera un marcador para MSC¹⁷⁷. Además de estos

marcadores, ambas expresan STRO-1, que es un marcador aislado en los progenitores multilíneaje de médula ósea. Por el contrario, no se aprecia expresión de CD31, CD34 ni CD45.

En resumen, podría decirse que las CMDL presentan el siguiente fenotipo molecular¹⁹⁰:

- Positividad para CD9, CD10, CD13, CD44, CD29, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA-I, fibronectina, endomucina, ASMA (Alfa actina específica de músculo liso), vimentina y colágeno tipo I.
- Negatividad para CD11b, CD19, CD31, CD34, CD79, CD45, CD79 α , CD80, CD117, CD 144, HLA-DR, c-Kit, HLA-DR, MyD88, STRO-1 y lin.

La multipotencialidad *in vitro* de las CMDL ha sido demostrada en numerosos trabajos¹⁹¹. Debido a su origen mesodérmico, son capaces de diferenciarse en células de la línea adipogénica¹⁹², osteogénica¹⁹³, condrogénica¹⁹⁴ y miogénica¹⁹⁵ músculo esquelético¹⁹⁵, liso¹⁹⁶ y miocardiocitos¹⁹⁷. Al igual que las células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea, las CMDL pueden diferenciarse en líneas celulares mesodérmicas, endodérmicas y ectodérmicas: células endoteliales¹⁹⁸, células epiteliales¹⁹⁹, hepatocitos²⁰⁰, células pancreáticas²⁰¹ y células del sistema nervioso²⁰².

iv) Aplicación clínica de la terapia celular

Tras la experimentación *in vitro* e *in vivo* con las CMDL y comprobar su capacidad de diferenciación así como los beneficios de los factores tróficos que produce

según el entorno regulando la inflamación, la respuesta inmune, los procesos de cicatrización y angiogénesis, ésta ha sido trasladada a numerosos campos clínicos.

La primera utilización clínica de CMDL autólogas en cirugía ortopédica fue para el tratamiento de defectos óseos craneales en 2004. Una niña de 7 años con un defecto óseo calvario post-traumático fue tratada con injerto de hueso esponjoso autólogo de cresta ilíaca combinado con CMDL, gel de fibrina y una matriz biodegradable. Posteriormente, mediante escáner, se comprobó la formación de tejido óseo y la ausencia de solución de continuidad en el defecto²⁰³.

Debido a su capacidad para diferenciarse en tejido adiposo se han utilizado para reconstrucciones mamarias tras resecciones tumorales, asimetrías mamarias, defectos subdérmicos postquirúrgicos o quemaduras en esta región²⁰⁴. Se realiza una transferencia de estas células junto con una muestra de grasa libre en un proceso denominado lipotransferencia asistida por células (LAC) y éstas contribuyen al mantenimiento del volumen de grasa transplantado.

En Cardiología, las MSC se han utilizado para regeneración de músculo cardíaco, para mejorar la función muscular después de un infarto agudo o en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica²⁰⁵. También se han utilizado de forma efectiva en el tratamiento de enfermedades isquémicas debido a su capacidad para provocar neovascularización²⁰⁶.

En Endocrinología se han utilizado en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 para generar células productoras de insulina, glucagón y somatostatina²⁰⁷. También se investiga su posible papel en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral

amiotrófica, así como en el infarto cerebral o en las lesiones de nervios periféricos. En estudios experimentales con ratas se ha demostrado la capacidad de mejorar la capacidad de cicatrización en lesiones del nervio ciático²⁰⁸.

Debido a sus propiedades inmunosupresoras²⁰⁹, las CMDL pueden utilizarse en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Yañez y cols.²¹⁰ realizaron un ensayo clínico en el que las CMDL eran administradas de forma intravenosa en pacientes que presentaban EICH aguda refractaria al tratamiento con corticoesteroides. La enfermedad se curó de forma completa en 5 de los 6 pacientes y 4 de ellos completaron un seguimiento medio de 40 meses sin presentar efectos secundarios.

En Cirugía Plástica y Reconstructiva y Cirugía Maxilofacial se han utilizado para reconstrucciones de nariz, oreja y tejido periodontal²¹¹. El potencial terapéutico de las CMDL para la cicatrización de las heridas demostrado en estudios experimentales ha sido utilizado para el tratamiento de úlceras crónicas causadas por tratamientos de radioterapia. Rigotti y cols.²¹² inyectaron CMDL en 20 pacientes con secuelas de radioterapia tras sufrir cáncer de mama, con severos síntomas y daño funcional, obteniendo remisión de los síntomas en todos los pacientes.

Una de las aplicaciones clínicas mejor estudiadas es la utilización de las CMDL para el tratamiento de las fístulas crónicas en la Enfermedad de Crohn. El laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de La Paz en Madrid es pionero en la aplicación de CMDL. García Olmo y cols.^{187,213} han realizado ensayos clínicos implantando células troncales autólogas y alogénicas en pacientes que

presentaban fistulas complejas perianales, rectovaginales y en el tracto respiratorio superior; es más, el tratamiento de la patología fistulosa perianal es el primero en terapia celular en cumplir todas las fases de un ensayo clínico y este mismo año ha finalizado con éxito.

También se han desarrollado numerosos proyectos de tesis doctorales basados en la utilización de CMDL. Se han empleado biosuturas con CMDL para anastomosis traqueales, cólicas y en tendón de Aquiles. El uso de CDML en forma de biosuturas en la reparación del tendón de Aquiles demostró una disminución del fenómeno inflamatorio y de la cantidad de adherencias sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas en la resistencia de la misma en un ensayo a tracción²¹⁴.

v) Terapia celular y manguito rotador

El uso de MSC en manguito rotador es muy reciente. Hasta 2009 no se publicó el primer trabajo en el que se emplearon células derivadas de médula ósea. Gulotta y cols.²¹⁵ realizaron un estudio experimental con células madre derivadas de médula ósea en ratas en el que realizaron una desinserción unilateral del tendón supraespinoso y lo repararon mediante sutura transósea. Demostraron que las MSC estaban presentes en la zona de la reparación y eran metabólicamente activas. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, desde un punto de vista biomecánico ni histológico, a las 4 semanas se apreciaba mayor contenido en fibrocartílago y mejor orientación de las fibras de colágeno. Posteriormente, este mismo grupo de investigación ha utilizado MSC modificadas utilizando terapia genética para que expresen el gen scleraxis con resultados prometedores. El gen de la scleraxis se ha visto que tiene un papel fundamental en

la diferenciación celular para el desarrollo de la inserción hueso-tendón²¹⁶.

Recientemente se ha publicado el primer estudio en un modelo animal de manguito usando células mesenquimales derivadas de grasa (CMDL). Oh y cols.²¹⁷ compararon el uso de CMDL y suero salino en tendón subescapular de conejo, observando una mejor función muscular y la disminución de la infiltración grasa del músculo para el grupo con CMDL.

En nuestro laboratorio de investigación y como parte de esta misma línea experimental se han realizado diferentes modelos experimentales utilizando CMDL con un vehículo de colágeno²¹⁸ y un vehículo de fibrina²¹⁹.

El uso de MSC en humanos es todavía escaso, sin embargo algunos autores han comenzado a desarrollar estrategias para su futuro uso clínico. Beitzel y cols.²²⁰ estudiaron la cantidad y calidad de células derivadas de médula ósea extraídas de húmero proximal y fémur distal y las encontraron comparables. Randelli y cols.²²¹ y Utsunomiya y cols.²²² fueron capaces de obtener MSC de tejido del manguito rotador y de la bursa sinovial respectivamente.

Por último, existen pocos trabajos de uso clínico de MSC. Ellera Gomes y cols.²²³ realizaron un trabajo en 14 pacientes con roturas completas del manguito rotador reparadas con puntos transóseos a través de una mini-incisión en el que se utilizaron células troncales mononucleares autólogas procedentes de aspirado de médula ósea de cresta ilíaca. En el seguimiento a 12 meses, se demostró la presencia de integridad del tendón mediante resonancia magnética en los 14 pacientes. Más recientemente, Hernigou y cols.²²⁴ publicaron los resultados de un estudio con un seguimiento de 10 años. 45 pacientes recibieron un concentrado de

BM-MSD tras cirugía artroscópica de sutura de manguito rotador (hilera simple). A los 10 años el 87% de los tendones del grupo con células estaban íntegros en comparación con el 44% del grupo control sin aporte de células.

Actualmente existe escasa información relativa al uso de CMDL en seres humanos para la reparación del manguito rotador. Por una parte, son necesarios estudios de experimentación que confirmen la seguridad de esta terapia y, en segundo lugar, analizar el beneficio obtenido con su aplicación en las lesiones del manguito rotador.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL TRABAJO

Hipótesis nula: La utilización de CMDL asociadas al uso de PRP en la reparación de una rotura aguda del tendón supraespinoso en un modelo experimental en rata, no mejora las propiedades biomecánicas e histológicas del área de cicatrización de la entesis.

Hipótesis alternativa: La utilización de CMDL asociadas al uso de PRP en la reparación de una rotura aguda del tendón supraespinoso en un modelo experimental en rata, mejora las propiedades biomecánicas e histológicas del área de cicatrización de la entesis.

Objetivo del trabajo

Analizar en un modelo murino estandarizado si el uso de CMDL y PRP mejora las características histológicas y biomecánicas de la reparación aguda de una desinserción del manguito rotador

3. MATERIAL Y MÉTODO

1) Diseño del estudio

Estudio prospectivo experimental controlado y aleatorizado tipo ensayo clínico.

2) Población del estudio.

a) Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio ratas Sprague-Dawley, hembras, con un peso entre 250 y 330 g.

b) Criterios de exclusión

No se considero ningún motivo de exclusión.

3) Variables a estudio

a) Independientes

Tratamiento: se consideró el tratamiento realizado como variable independiente, dicotomizado en: tratamiento quirúrgico con PRP y células troncales derivadas de tejido graso y tratamiento quirúrgico con PRP.

b) Dependientes

i) Biomecánicas

Las variables biomecánicas se estudiaron mediante estudio a tracción hasta rotura de la entesis en una prensa electromecánica de la marca SERVOSIS®.

Carga o tensión de rotura

Se define como la resistencia máxima de la unión hueso-tendón. Se mide en Newtons (N).

Carga elástica o límite de elasticidad

Se define como la alcanzada por un material cuando su deformación, sometido a carga, desaparece inmediatamente al retirarla. Se calcula en Newton (N).

Deformación mecánica

Es el alargamiento experimentado en la entesis o zona de estudio durante el ensayo. Se mide en milímetros (mm). En nuestro trabajo se emplea la deformidad máxima, que corresponde al punto de mayor elongación en la zona elástica del tendón.

Rigidez

Es la capacidad de no deformarse al aplicar una fuerza. Esta representado por la pendiente de la curva tensión-deformación en la zona elástica del material. En ella las tensiones aplicadas son proporcionales a los alargamientos producidos, siendo la pendiente el modulo de elasticidad longitudinal o módulo de Young. Se mide en N/mm^2 .

Energía absorbida

Es el área bajo la curva tensión-deformación y nos indica la energía total absorbida por la unión hueso-tendón hasta la rotura. Se calcula en Julios (J).

ii) Histológicas

Vasos:

Para evaluar la cantidad de vasos neoformados se llevó a cabo el conteo del número de pequeños vasos (capilares, arteriolas y vénulas) presentes en cada una de las muestras incluidas en el estudio. Para detectar dichos vasos, éstos fueron marcados mediante técnica inmunohistoquímica utilizando el marcador de células

endoteliales CD31.

En cada uno de los casos del estudio, se realizó una media aritmética del número de pequeños vasos, contados en 20 microfotografías realizadas con un objetivo 40x. Se estableció el siguiente gradiente:

0: ausente, máximo 1 capilar por cada campo de 40x.

1: mínima, máximo 4 vasos de pequeño calibre por cada campo de 40x.

2: moderada, entre 5 y 12 vasos de pequeño calibre por cada campo de 40x.

3: marcada, más de 13 vasos de pequeño calibre por cada campo de 40x.

Valoración del edema

Estudiando las preparaciones teñidas con H/E se adjudicó un valor numérico en función del grado de edema observado, siguiendo el siguiente criterio:

0: ausencia de edema.

1: presencia de edema.

2: marcado edema.

Valoración del grado de infiltración de células inflamatorias (PMN, linfocitos, macrófagos):

Se realizó un conteo con microscopio de 40 aumentos en 10 campos aleatorios de las células inflamatorias. Se calculó la media.

0: ausencia de células.

1: 1-3 células por campo.

2: 4-15 células por campo.

3: más de 15 células por campo.

Fibroblastos

Se realizó un conteo de fibroblastos en 10 campos aleatorios. Se calculó la media.

0: ausencia de fibroblastos.

1: 0-1 fibroblastos.

2: 2-3 fibroblastos.

3: más de 3 fibroblastos.

Fibrocartílago

Se cuantificó la presencia de fibrocartílago en la zona de unión hueso-tendón observando las preparaciones teñidas con H/E y con la técnica de Masson.

0: ausencia de fibrocartílago.

1: presencia de fibrocartílago en menos del 25% de la unión hueso-tendón.

2: presencia de fibrocartílago entre 25% y 50% de la unión hueso-tendón.

3: presencia de fibrocartílago mayor del 75% de la unión hueso-tendón.

Colágeno tipo I y III

Se cuantificó usando la técnica de Rojo Sirio con el microscopio de luz polarizada.

El colágeno tipo I produce una refringencia amarillo anaranjada y el colágeno tipo III una refringencia amarillo verdosa.

0: ausencia de colágeno.

1: presencia de colágeno en menos del 25% del tejido.

2: presencia de colágeno entre 25% y 50% del tejido.

3: presencia de colágeno mayor del 75% del tejido.

Fibras elásticas

Se cuantificó la presencia de fibras elásticas en la unión hueso-tendón.

0: ausencia de fibras.

1: presencia de fibras.

Escala modificada de Watkins

Para valorar el grado de regeneración de la entesis se utilizó la escala modificada de Walkins.

Variables	Puntuación
Celularidad	Marcada (1) Moderada (2) Leve (3) Mínima (4)
Tenocitos	<25% (1) 25-50% (2) 50-75% (3) >75% (4)
Paralelismo de las células	<25% (1) 25-50% (2) 50-75% (3) >75% (4)
Vascularización	Marcada (1) Moderada (2) Leve (3) Mínima (4)
Fibras de gran diámetro	<25% (1) 25-50% (2) 50-75% (3)

	>75% (4)
Paralelismo de las fibras	<25% (1) 25-50% (2) 50-75% (3) >75% (4)
Aspecto de la inserción tendón-hueso	Inserción con continuidad sin hueso o cartílago (1) Inserción con continuidad con hueso sin células fibrocartilaginosas (2) Inserción con continuidad con hueso y células fibrocartilaginosas pero sin frente de calcificación o “tidemark” (3) Inserción con continuidad con hueso, células fibrocartilaginosas y frente de calcificación o “tidemark” (4)

Tabla 4. Escala modificada de Watkins.

4) Material para medir las variables

a) Animal de experimentación

Para el estudio se emplearon ratas hembra de la raza Sprague-Dawley con un peso entre 250 y 330 g y una edad aproximada de 8 semanas. Para la realización del estudio se obtuvo la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal.

Se emplearon un total de 50 animales, 24 para el estudio histológico, 24 para el estudio biomecánico y 2 para la obtención de PRP.

Todos los animales fueron estabulados previamente a la cirugía en jaulas de 2 ó 3 animales para su adaptación, durante un mínimo de 2 semanas. Las jaulas se almacenaron en una sala con control de ruido, regulación de temperatura y luz

para mantener un adecuado ciclo circadiano del animal. Fueron alimentados con una dieta estándar para la especie (Panlab S.L.) y dispusieron de agua *ad libitum*.

b) Material para el procedimiento

Se empleó una caja de instrumental básico de cirugía (porta agujas, pinzas tipo Adson con y sin dientes, tijera de disección y tijera de hilos), bisturís desechables del número 15 y del número 11, suero salino fisiológico, gasas y clorhexidina jabonosa.

Un microscopio óptico para la identificación y sutura del tendón del supraespinoso.

Un taladro con broca de 1 mm de diámetro para la realización del túnel transóseo.

Para la sutura tendinosa se empleó una sutura de polipropileno de 5/0 (Prolene®) y para la sutura del deltoides y la piel seda de 3/0.

Una cámara de inducción anestésica y un equipo de anestesia inhalada con isoflurano (Forane®).

Una manta térmica para evitar la hipotermia del animal durante la cirugía y la recuperación tras la anestesia.

Cemento óseo Palacos® Zimmer y una jeringa de 5 cc para incluir el húmero en cemento. Se empleó papel de lija para sujetar la escápula en las mordazas de la prensa electromecánica.

c) Máquina de ensayos:

Para la evaluación biomecánica de las muestras se empleó una prensa electromecánica de la marca SERVOSIS®. La máquina dispone de dos mordazas neumáticas con acoplamiento de caucho para la sujeción de las muestras biológicas.

El sensor de posición es un codificador óptico lineal y los captadores de fuerza son células de carga de la firma HBM de 20 y 200 N. Están calibrados para detectar incrementos a partir de 1 N. Los datos son recogidos a través de un software de control universal PCD-2K diseñado para el sistema operativo Windows.

Las muestras de tejido se colocaron con la escápula en la mordaza superior y el húmero, incluido en cemento, en la mordaza inferior.

La velocidad de desplazamiento de las mordazas fue 0,014 mm/s y las muestras se pretensaron con una carga de 0,1 N.



Imagen 18. Prensa electromecánica de la marca SERVOSIS® empleada en nuestro trabajo

5) Método de medida de las variables

a) Grupos de estudio

Se realizaron 2 estudios: un grupo para estudio histológico y otro grupo para estudio biomecánico, ambos compuestos por 24 animales.

A su vez, se dividieron en 2 grupos de 12 animales, según se implantase PRP o PRP y células.

En cada grupo, se sacrificaron para estudio biomecánico y estudio histológico los animales a intervalos de :

- 3 días
- 1 semana

- 2 semanas
- 4 semanas

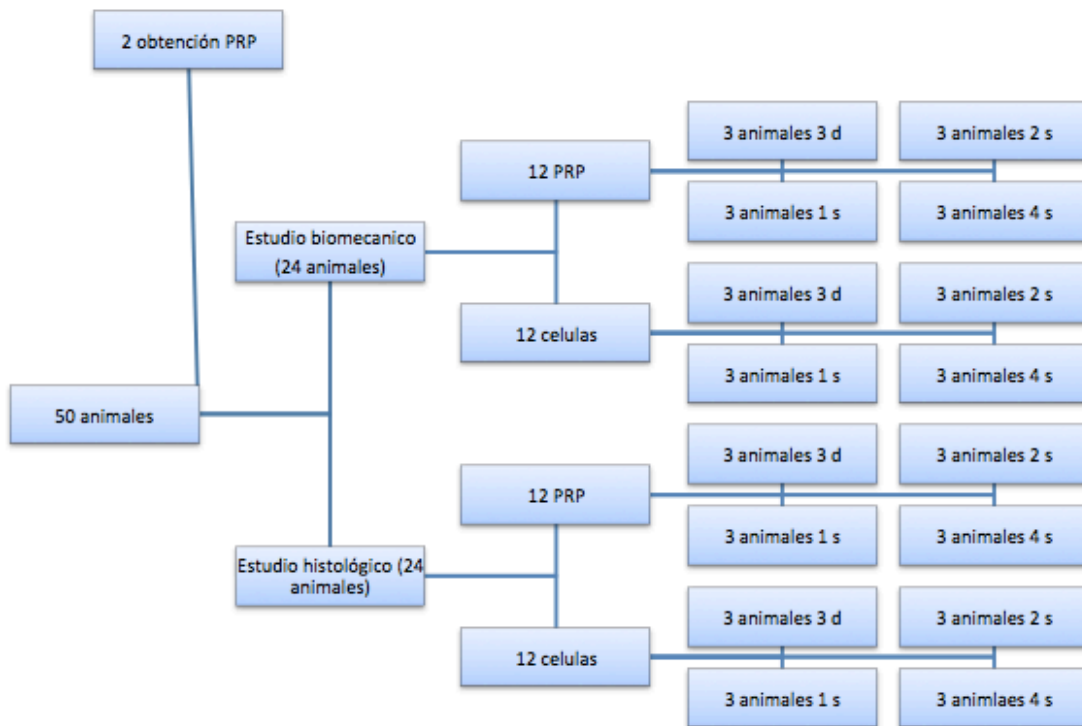


Imagen 19. Esquema que representa la distribución en los distintos grupos de los animales de experimentación (d: días, s: semanas).

b) Obtención y expansión de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMDL):

La obtención y expansión de las CMDL fue realizada por el equipo del Dr. García-Olmo y el Dr. García-Arranz en el Laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario La Paz. El protocolo seguido es una modificación del empleado por el mismo equipo para la obtención de CMDL a partir de tejido graso humano¹⁸⁸.

Todo el proceso de obtención de las células troncales y su manipulación se realiza en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. El primer paso consiste en la extracción del tejido adiposo subdérmico de dos ratas SD hembras, bajo anestesia inhalatoria con 1,5% de isoflurano/oxígeno. El tejido adiposo

obtenido se lava en un tampón salino fosfato (PBS), posteriormente se disgrega mediante tijera y bisturí y, nuevamente, se lava con el tampón salino fosfato. Después se centrifuga a 250 G durante 10 minutos a temperatura ambiente, con lo que se separan las células y el tejido adiposo de otros restos tisulares. El producto obtenido es sometido a la acción enzimática de la colagenasa tipo I (0,075%) en agitación durante 45 minutos a 37°C; pasado ese tiempo se neutraliza la digestión mediante el mismo volumen de Suero Fetal Bovino, Gibco® (FBS) y se somete de nuevo a centrifugación a 300G durante 10 minutos; el producto obtenido es lo que se conoce como fracción vículo-estromal (SVF).

El precipitado se filtra con una malla de 40μ de diámetro de poro, para separar las células de los tejidos sin disgregar y se procede a su cultivo. Utilizamos como medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 10 % Suero fetal Bovino, 2mM Glutamina y 1% antibiótico (estreptomicina 10 μg/ml y penicilina 1 UI/ml) cultivado a 37°C y 5% de CO₂.

Antes de iniciar el cultivo y expansión celular, se recogen 10 μl de la suspensión de células y se procede al recuento de las células viables, según el método de exclusión por tinción con azul tripán (media 2,5x10⁶ células nucleadas por mililitro de tejido graso resuspendido). Después, las células se siembran a razón de 30.000-50.000 células/cm² de superficie plástica de los recipientes de cultivo celular. Se cultivan a 37°C, 5% de CO₂ y 90-95% de humedad relativa. A las 24 horas se eliminan del medio de cultivo las células no adheridas mediante la aspiración del medio de cultivo y el lavado de los cultivos con tampón fosfato salino. Después se añade de nuevo medio de cultivo, proceso que se repite cada 3-4 días. En este punto, se observan en los frascos de cultivo numerosas células adheridas al

plástico con formas fibroblásticas. Con el paso de los días, las células se extienden hasta cubrir toda la superficie disponible.

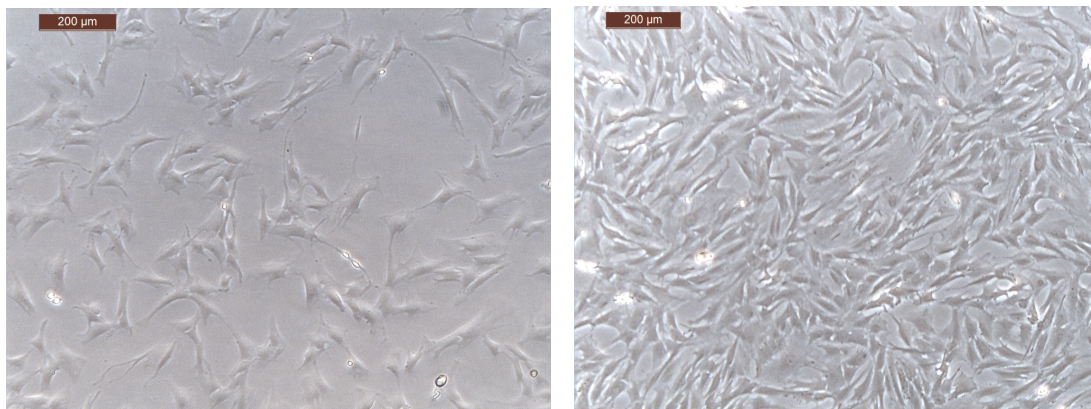


Imagen 20. CMDL en distintas fases de confluencia.

Cuando se alcanza el 80% de confluencia, las células se despegan de la placa de cultivo con tripsina/EDTA. Tras neutralizar la tripsina con medio de cultivo, se centrifuga a 300G durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Ahora comienza el proceso de expansión celular; se realiza un recuento de las células obtenidas y se subcultivan a razón de 30000-50000 células/cm² para expandir hasta el número necesario. Durante este proceso, algunas de las células se criopreservan en una solución de 10% de dimetilsulfóxido en suero fetal bovino y se almacenan en nitrógeno líquido hasta su futura utilización. Se ha demostrado que pueden criopreservarse de forma indefinida manteniendo su viabilidad y propiedades biológicas²²⁵. No está claro hasta cuándo pueden expandirse, algunos autores han comunicado que son estables genética y fenotípicamente, incluso, tras la expansión que supone doblar 200 veces la población inicial²²⁶. En nuestro estudio, las células fueron congeladas tras 3 pases celulares. Previo a su implantación, en nuestro estudio se descongelaron a temperatura ambiente y se

cultivaron durante 7 días hasta alcanzar el número de 2 millones de células.

c) Caracterización de MSC

Actualmente se ha aceptado por la comunidad científica internacional que las MSC deben tener las siguientes características y los siguientes marcadores de membrana²²⁷:

- Las células se adhieren a las placas de cultivo.
- Son positivas para los siguientes marcadores de membrana (CD9, CD29, CD44, CD49a, CD51, CD73, CD90, CD105; como mínimo requisito - CD73, CD90 y CD105).
- Son negativas para los siguientes marcadores de membrana (CD3, CD11b, CD14, CD34, CD45, CD54, CD133, CD79 α , CD19 y HLA-DR).

Las células utilizadas en el presente estudio han sido caracterizadas mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo, cumpliendo los criterios por lo que se definen como MSC. Además, fueron diferenciadas tras su descongelación a osteocitos y adipocitos, para demostrar que no habían perdido la capacidad de diferenciación, según los siguientes protocolos:

a) Diferenciación a adipocito

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y se mantuvieron en cultivo renovando el medio cada 3-4 días hasta llegar a confluencia. Tras varios días confluentes se indujo su diferenciación a adipocitos. El medio de cultivo adipogénico (medio de inducción) se componía de: DMEM-10 suplementado con isobutil-metilxantina 0,5 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), dexametasona 1 μ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), insulina 10

μm (Actrapid®, NovoNordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca) e indometacina 200 μm (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) durante 14 días, renovándolo cada 2 días. Posteriormente las células se cultivaron durante 4 días más con DMEM-10 suplementado sólo con insulina 10 μm (medio de mantenimiento). Los controles negativos fueron CMDL cultivadas sólo con DMEM-10 durante el mismo periodo de tiempo. Tras fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, la acumulación de lípidos se visualizó mediante la tinción con Oil Red O (ORO) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) al 0,3% en isopropanol al 60% durante 30 minutos en agitación suave. El exceso de colorante se eliminó mediante varios lavados con PBS.

b) Diferenciación a osteocito

Bajo las mismas condiciones de siembra que en el apartado anterior, las células confluentes fueron inducidas a diferenciarse a osteocitos mediante la incubación con medio osteogénico durante 28 días, renovando el 60% del volumen cada 3-4 días. La composición del medio fue la siguiente: DMEM-10 suplementado con dexametasona 0,01 μm , ascorbato-2-fosfato 50 μm (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), y glicerofosfato 10 mm (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU). El control negativo de diferenciación consistió en cultivar las células con DMEM-10 durante 28 días. Tras el periodo de incubación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los depósitos ricos en calcio secretados por los osteocitos a la matriz extracelular se visualizaron mediante la tinción de Rojo de Alizarina S (ARS, del inglés, Alizarin Red S) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU). Las células fijadas se incubaron con ARS al 1% en agua destilada con pH de 4,1 durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, con

agitación suave. A continuación, el exceso de colorante se eliminó tras varios lavados con agua destilada.

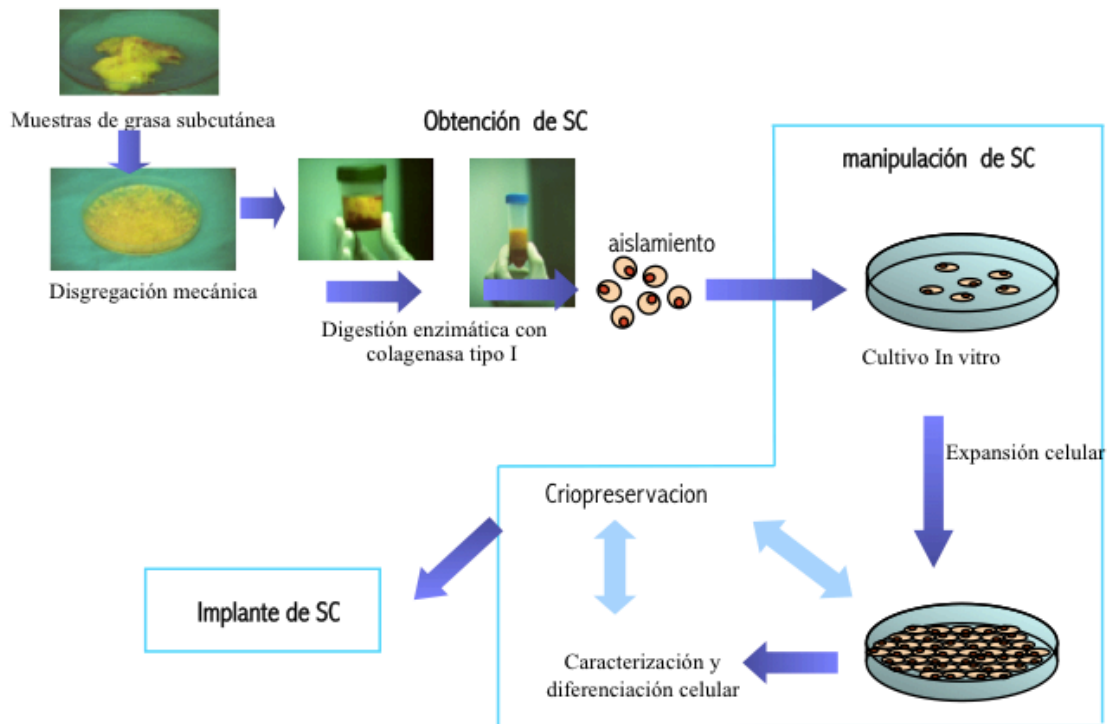


Imagen 21. Esquema del procesado celular. SC: células madre (“stem cells”)

d) Obtención de PRP

El proceso de separación del plasma rico en plaquetas fue diseñado por E. Anitua²²⁸⁻²³⁰. Parte de pequeños volúmenes de sangre (superiores a 10 ml) y activa la formación del coágulo mediante dosis exactas de cloruro cálcico (Cl_2Ca) evitando así los inconvenientes de la trombina bovina.

Para la obtención de plasma rico en plaquetas, se emplearon 2 ratas SD hembras. Previa anestesia inhalada con isofluorano (Forane®), se realizó punción intracardiaca percutánea y se obtuvieron de 20 cc de sangre que se conservaron en tubos citratados. El plasma se separó mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos y solamente se aspiró con pipeta la parte del

plasma más cercana a la capa nucleada o “buffy coat” (zona de mayor concentración de factores). De esta forma obtenemos la parte más concentrada del plasma sin leucocitos que quedan incluidos en la capa “buffy coat”. Una vez aspirado el plasma, se dividió en alícuotas de 35 µl y se congeló a -20 °C durante un tiempo máximo de un mes.

e) Preparación PRP y células para implantación

El plasma se descongeló durante 30 minutos manteniéndose refrigerado. Previo a su implantación se añadió cloruro cálcico que neutraliza el efecto anticoagulante del citrato y gelifica la muestra en unos 30 segundos a temperatura ambiente y agitación. Una vez gelificado era posible su manipulación con una pinza de disección siendo depositado en el punto de unión del tendón con el húmero entre ambos cabos de la sutura.

En los grupos que se implantaban células y PRP, en primer lugar se añadieron las células al PRP y posteriormente se incorporó gluconato cálcico a la mezcla para conseguir el efecto de un gel embebidas en CMDL.

Para la coagulación del plasma fue necesario añadir en ambos grupos 2,1 µl de cloruro cálcico (Cl_2Ca) con una concentración del 10%.

f) Procedimiento quirúrgico

Todas las cirugías fueron realizadas por el autor en el laboratorio del animalario del Hospital Universitario la Paz. La lateralidad y la implantación de PRP o células + PRP fue aleatorizada. Previo a la cirugía, se realizó un rasurado del miembro a intervenir y un lavado prequirúrgico con clorhexidina. En todos los casos sólo se intervino uno de los miembros del animal para permitir reposo a demanda

durante el postoperatorio y evitar el fracaso por exceso de carga.

La inducción anestésica se realizó en una cámara específica con isofluorano inhalado (Forane®) a concentración de 2 L/min y oxígeno a 1,5 L/min. Tras la inducción se mantuvo una anestesia inhalada con isofluorano a 1 L/min y oxígeno a 1 L/min. El animal fue intervenido sobre una manta térmica para prevenir la hipotermia.

Usando un bisturí desechable del número 15 se realizó una incisión longitudinal de unos 2 cm, centrada sobre el borde lateral del acromion. A continuación, se realizó un corte transversal sobre el músculo deltoides a unos 2 mm del borde lateral del acromion para exponer la musculatura del manguito rotador de la rata. El tendón del supraespinoso de la rata se encuentra limitado a un lado, por el tendón del infraespinoso, que es claramente mayor en diámetro y al otro lado, por el tendón de la porción larga del bíceps, que presenta una morfología tubular. Previo al corte del tendón, se realizó la sutura del mismo mediante técnica de Mason-Allen modificada⁸ con polipropileno de 5/0 (Prolene®) y paso de los hilos a través de túnel transóseo. El túnel transóseo se realizó en la parte más proximal de la diáfisis humeral, usando una broca de 1 mm.

Con una hoja de bisturí del número 11 se realizó el corte del tendón a nivel de su inserción humeral y se cruentó la zona de inserción en el húmero para favorecer el sangrado. Por último, antes de realizar el anudado de los hilos se depositó el coágulo de PRP o PRP y células entre el tendón supraespinoso y la zona preparada del húmero y se anudaron los hilos, según técnica estándar.

Se suturó el músculo deltoides con un mínimo de 4 puntos simples para disminuir

el riesgo de dehiscencia y se suturó la piel con seda de 3/0, teniendo especial cuidado en dejar los hilos muy cortos para evitar que el animal pudiese tirar de ellos y producir dehiscencia de la herida.

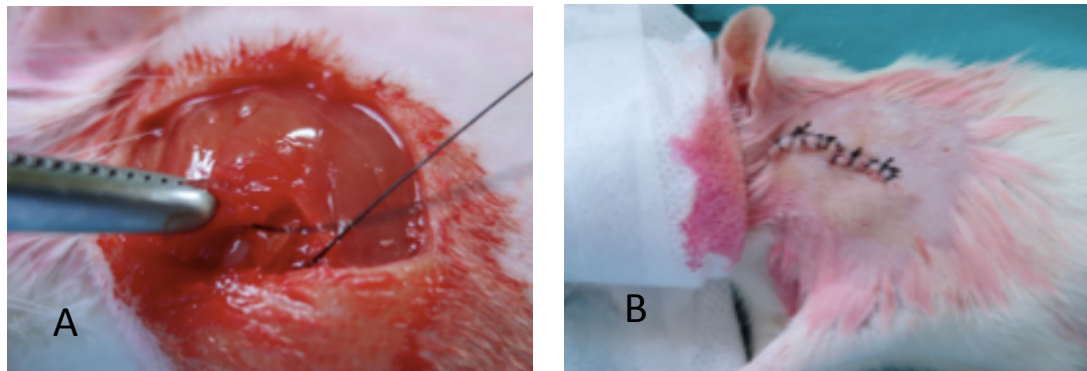


Imagen 22. La imagen A muestra el implante del coágulo de PRP y proceso de anudado. La imagen B muestra la sutura de la piel con cabos cortos.

Al terminar la intervención se suspendió el isoflurano y se aumento el oxígeno a 3 L/min hasta el despertar del animal. Se inyectó una dosis de tramadol subcutánea, ajustada al peso del animal (5-10 mg / kg de peso) y se colocó al animal bajo lámpara de calor dentro de la jaula. Se depositó alimento en el suelo de la jaula para facilitar su alimentación y se comprobó que dispusiera de agua suficiente. La analgesia con tramadol se repitió cada 12 horas durante las primeras 48 horas.

g) Sacrificio y preparación de muestras

En nuestro estudio se establecieron 4 grupos según el tiempo desde la cirugía:

- 3 días
- 1 semana
- 2 semanas
- 4 semanas

El animal fue nuevamente anestesiado en cámara y fue sacrificado mediante inyección intracardiaca percutánea de cloruro potásico 5 molar (ClK). Posteriormente, se realizó la preparación de las muestras que fue distinta según formaran parte del estudio biomecánico o histológico.

h) Preparación de las muestras para el estudio histológico

Se realizó apertura de la cicatriz previa y disección, para realizar amputación supracóndilea del húmero y disociación escapulotorácica, manteniendo integra la musculatura periescapular, el deltoides y todo el manguito rotador.

Las muestras fueron suspendidas inmediatamente en una solución de formaldehído al 4% durante 72 horas. Posteriormente, se descalcificaron con una solución de EDTA 1:20 durante 21 días, cambiando la solución cada 3 días. Finalizada la descalcificación, se procedió a la deshidratación de las muestras con etanol a concentraciones crecientes (70º, 80º, 96º y 100º), y tras baño de tolueno, se incluyeron en parafina (Panreac Química SAU, Barcelona, España).

Se efectuaron cortes de 5 micras en el eje longitudinal y coronal para la realización de técnicas histológicas. Posteriormente, se procedió a su evaluación mediante distintas técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. En todos los casos las muestras se examinaron utilizando un microscopio Axioplan 2 (Zeiss). Las imágenes digitales se realizaron con una cámara Axiocam HCR (Zeiss).

Las técnicas histológicas que se realizaron fueron las siguientes:

1. Tinción con hematoxilina-eosina.

Este método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que tiñe las

estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como los núcleos celulares, y el uso de eosina, que tiñe los componentes básicos (acidófilos) en tonos color rosa, como el citoplasma.

2. Tricrómico de Masson

Técnica histológica diseñada para el estudio de las fibras de colágeno y el tejido conjuntivo. Las fibras de colágeno se tiñen de azul intenso, los núcleos celulares de azul negruzco y los citoplasmas, fibras musculares y eritrocitos de rojo intenso.

3. Tinción de Verhoff-Van Gieson y orceína

Técnica histológica diseñada para el estudio de las fibras elásticas.

4. Rojo Sirio

Técnica histológica diseñada para la distinción mediante microscopio de luz polarizada entre el colágeno tipo I y colágeno tipo III.

Técnicas de inmunohistoquímica

Técnica histológica diseñada para valorar el grado de vascularización del tendón neoformado. En este trabajo se empleó el anticuerpo CD31 antibody de Biorbyt (orb229364). El antígeno CD31 es una proteína transmembrana implicada en la unión de células endoteliales entre sí y con leucocitos. Se expresa en la superficie de las células endoteliales, encontrándose en todos los endotelios continuos (arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares).

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1º. Se bloqueó la peroxidasa endógenas tratando los cortes de tejido con 100 microlitros de una disolución de H₂O₂ al 3% durante 15 minutos a temperatura

ambiente y en oscuridad.

2º. Se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con tampón salino fosfato (PBS) TWEEN® (Sigma-Aldrich, Alemania).

3º. Se realizó el bloqueo cubriendo los cortes de tejido con 100 microlitros de PBS 10% a temperatura ambiente durante una hora en la cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se decanta la solución y se añade 100 microlitros de una disolución 1/50 del anticuerpo primario y se realiza una incubación “over-night” en la cámara húmeda a 4°C.

4º. Se elimina la disolución del anticuerpo primario y se realizan tres lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno.

5º. A continuación utilizamos como sistema de revelado el KIT MASVISION UNIVERSAL POLIVALENTE (Master Diagnostica, España), por ser altamente sensitivo y proporcionar una baja tinción de fondo. Se añade sobre la sección de tejido 100 microlitros del complejo constituido por polímero conjugado con peroxidasa y la fracción de inmoglobulina F(ab) que proporciona el kit. Se incuba a temperatura ambiente 15 minutos.

6º. A continuación se realizan tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

7º. Se deshidrataron las muestras mediante pasos sucesivos en alcohol de graduación creciente, se aclararon en xilol y se montaron con EUKITT (Labolan, España).

En todos los casos se realizó un control negativo, utilizando secciones de tejido en las que se realizó la técnica, pero omitiendo el paso de incubación con anticuerpo

primario.

i) Preparación de las muestras para el estudio biomecánico

Se realizó apertura de la cicatriz, amputación supracóndilea y disociación escapulotorácica igual que en el estudio histológico. En este grupo además se disecó y extirpó todos los tejidos salvo la escápula, los 2/3 proximales del húmero y el músculo supraespinoso preservando todo su origen en la escápula y su inserción en el húmero. A continuación se procedió a cortar la sutura de polipropileno del tendón y se congeló la muestra a -20° C durante un tiempo máximo de 1 mes, hasta la realización del experimento biomecánico.

Para realizar el estudio biomecánico se incluyó la parte humeral de la muestra en una jeringa de 1 ml con cemento óseo Palacos® Zimmer. En la mordaza superior de la prensa electromecánica, se colocó la parte humeral, incluida en cemento y contenida en la jeringa. La escápula se sujetó en la mordaza inferior en posición horizontal para que la fuerza de tracción sobre el tendón fuera axial. La distancia desde la mordaza inferior hasta la inserción tendinosa fue en todos los casos de 5 mm. Se precargó la máquina a 0,1 N en todos los ensayos y se inició la tracción del tejido a una velocidad de 0,014 mm/s, siguiendo el protocolo empleado en trabajos previos^{218,219}.

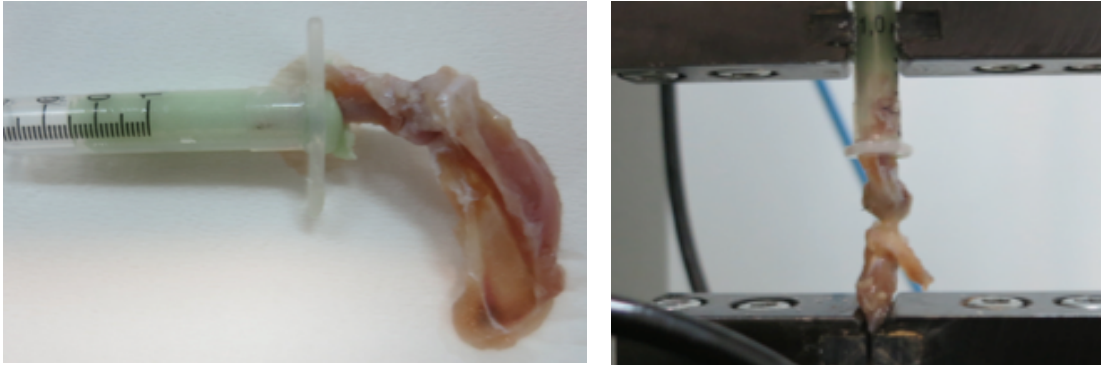


Imagen 23. Imágenes que muestran la inclusión de las muestras en una jeringa con cemento y su posterior colocación en la prensa electromecánica.

Se consideró el fin del ensayo cuando se observó clara rotura tendinosa asociada con caída brusca de la tensión hasta valores próximos a 0.

6) Método estadístico

1. Estadística descriptiva

Como índices de la tendencia central y de la dispersión de las variables cuantitativas se emplearon la media aritmética y la desviación estándar. No se utilizaron variables cualitativas.

2. Estadística inferencial

Para la evaluación biomecánica se realizó, en primer lugar, un estudio comparativo entre los dos grupos de tratamiento: PRP y PRP con células, estratificándolo por tiempos de sacrificio. En segundo lugar, se llevó a cabo una comparación por grupos de tratamiento para los distintos tiempos de sacrificio.

Para el estudio histológico, se efectuó nuevamente un análisis comparativo entre los dos grupos de tratamiento para cada tiempo de sacrificio. Posteriormente, se

desempeñó un estudio de tendencia temporal para analizar el comportamiento de las variables en función del tiempo.

Para determinar la asociación entre una variable independiente y otra variable dependiente cuantitativa se empleó el test U de Mann Whitney para muestras independientes, siendo la medida del efecto la diferencia de las medias.

Para analizar el comportamiento de las variables en función del tiempo se utilizó un modelo de regresión lineal para analizar la tendencia temporal semanal de las variables.

En todos los casos, como grado de significación estadística se empleó un valor de $p < 0,05$. Para la aplicación estadística se utilizó el paquete estadístico SPSS® versión 15.0 (IBM, Nueva York, Estados Unidos).

4. RESULTADOS

1) Complicaciones

Hubo 2 casos de infección superficial de la herida quirúrgica. Al realizar la disección quirúrgica no se observó afectación profunda al músculo deltoides y el manguito rotador no estaba afectado, por lo que no se descartaron las muestras.

Durante la realización del estudio, en el grupo de tratamiento de 72 horas, se observó que los tendones presentaban valores cercanos a 0 antes de romperse. Debido a esto se decidió excluir estas muestras para su análisis.

En una muestra del estudio, a las 4 semanas de tratamiento, al aumentar la fuerza de tracción del experimento se produjo una movilización del húmero dentro del cemento, esto se solucionó realizando una nueva inclusión en cemento, llegando hasta la parte más proximal de la diáfisis humeral.

En otra muestra del estudio a 4 semanas, se desinsertó parcialmente el supraespinoso de su origen en la escápula al aumentar la fuerza de tracción. Fue posible repetir el ensayo usando papel de lija en las mordazas y evitar así la rotura en la zona muscular. A partir de este experimento, se empleo en todas las demás muestras papel de lija para prevenir la rotura o desinserción en la escápula de la muestra.

2) Estudio biomecánico

a) Estadística descriptiva

En la tabla 5 se muestran los valores de cada variable en función del tratamiento y el tiempo.

VARIABLE	TIEMPO (semanas)	MEDIA (DE)
CARGA DE ROTURA (N)	1	TOTAL 2,29 (0,71) PRP 2,29 (0,68) PRP + C 2,29 (0,89)
	2	TOTAL 5,88 (2,66) PRP 3,89 (0,99) PRP + C 7,87 (2,18)
	4	TOTAL 13,97 (4,87) PRP 11,31 (1,48) PRP + C 16,62 (6)
CARGA ELÁSTICA (N)	1	TOTAL 1,98 (0,8) PRP 1,95 (0,9) PRP + C 2,02 (0,98)
	2	TOTAL 3,85 (2,62) PRP 2,16 (0,91) PRP + C 5,53 (2,8)
	4	TOTAL 11,37 (1,02) PRP 10,71 (0,38) PRP + C 11,81 (1,14)
DEFORMIDAD MÁXIMA (mm)	1	TOTAL 4,7 (2,75) PRP 5,01 (3,19) PRP + C 4,22 (3,03)
	2	TOTAL 5,26 (1,72) PRP 4,43 (2,2) PRP + C 6,1 (0,73)
	4	TOTAL 5,16 (2,84) PRP 3,94 (0,77) PRP + C 5,98 (3,65)

RIGIDEZ (N/mm²)	1	TOTAL 0,78 (0,34) PRP 0,73 (0,42) PRP + C 0,84 (0,27)
	2	TOTAL 1,57 (0,53) PRP 1,44 (0,74) PRP + C 1,7 (0,33)
	4	TOTAL 12,92 (21,47) PRP 3,5 (1,61) PRP + C 19,2 (27,8)
TIEMPO DE ROTURA (s)	1	TOTAL 327,04 (189,33) PRP 349,66 (207,13) PRP + C 293,12 (231,83)
	2	TOTAL 304,96 (136,64) PRP 274,84 (107,31) PRP + C 335,08 (180,11)
	4	TOTAL 363,48 (202,66) PRP 255,72 (7,1) PRP + C 435,32 (250,53)
ENERGÍA (J)	1	TOTAL 0,2 (0,24) PRP 0,13 (0,06) PRP + C 0,32 (0,42)
	2	TOTAL 0,99 (0,88) PRP 0,52 (0,39) PRP + C 1,47 (1,06)
	4	TOTAL 12,04 (14,78) PRP 4,07 (1,39) PRP + C 17,36 (18,16)

Tabla 5. Resultados del estudio biomecánico.

b) Estadística inferencial

i) Análisis en función del tratamiento

El peso medio inicial del grupo de tratamiento con PRP fue de 270,17 g (DE 11,74) y en el grupo de plasma y células fue 271,25 g (DE 12,45). El peso medio final del grupo de PRP fue 306,75 g (DE 37,44) y del grupo de plasma y células fue 307,42 g (DE 37,14). Ambos grupos resultaron comparables en peso inicial y final.

Se analizaron los resultados de las variables: carga de rotura, carga elástica, deformidad máxima, rigidez, tiempo de rotura y energía, en función del tiempo 1,2 y 4 semanas, comparando los resultados según el tratamiento empleado: PRP o PRP y células (ver tabla 6).

Variable	Tiempo de sacrificio (semanas)	PRP Media (DE)	PRP + C Media (DE)	Valor de p
Carga de rotura (N)	1	2,29 (0,68)	2,29(0,89)	0,827
	2	3,89 (0,99)	7,87(2,18)	0,05
	4	11,31 (1,48)	16,62(6)	0,127
Carga elástica (N)	1	1,95 (0,9)	2,02 (0,98)	0,564
	2	2,16 (0,91)	5,53 (2,8)	0,127
	4	10,71 (0,38)	11,81 (1,14)	0,139
Deformidad máxima (mm)	1	5,01 (3,19)	4,22 (3,03)	0,564
	2	4,43 (2,2)	6,1 (0,73)	0,275
	4	3,94 (0,77)	5,98 (3,65)	0,564

Rigidez (N/mm²)	1	0,73 (0,42)	0,84 (0,27)	1
	2	1,44 (0,74)	1,7 (0,33)	0,827
	4	3,5 (1,61)	19,2 (27,8)	0,564
Tiempo de rotura (s)	1	349,66 (207,13)	293,12 (231,83)	0,564
	2	274,84 (107,31)	335,08 (180,11)	0,513
	4	255,72 (7,1)	435,32 (250,53)	0,083
Energía (J)	1	0,13 (0,06)	0,32 (0,42)	0,083
	2	0,52 (0,39)	1,47 (1,06)	1
	4	4,07 (1,39)	17,36 (18,16)	0,275

Tabla 6. Análisis estadístico de los resultados biomecánicos.

En el grupo de 2 semanas la carga de rotura media fue de 7,87 N (2,66) en el grupo de PRP y células y de 3,89 N (0,99) en el grupo de PRP. Esta diferencia fue cercana a la significación ($p=0,05$).

En el grupo de 4 semanas los resultados no fueron estadísticamente significativos pero si hubo variables con tendencia a la significación: el tiempo de rotura fue 255,72 s (7,1) en el grupo de PRP y 435,32 s (250,53) en el grupo de PRP y células con una $p=0,083$. La energía fue 4,07 J (1,39) en el grupo de PRP y 17,36 J (18,16) en el grupo de PRP y células con una $p=0,083$. La carga de rotura fue 11,31 N (1,48) en el grupo de PRP y 16,62 N (6) en el grupo de PRP y células con una $p=0,127$.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de variables.

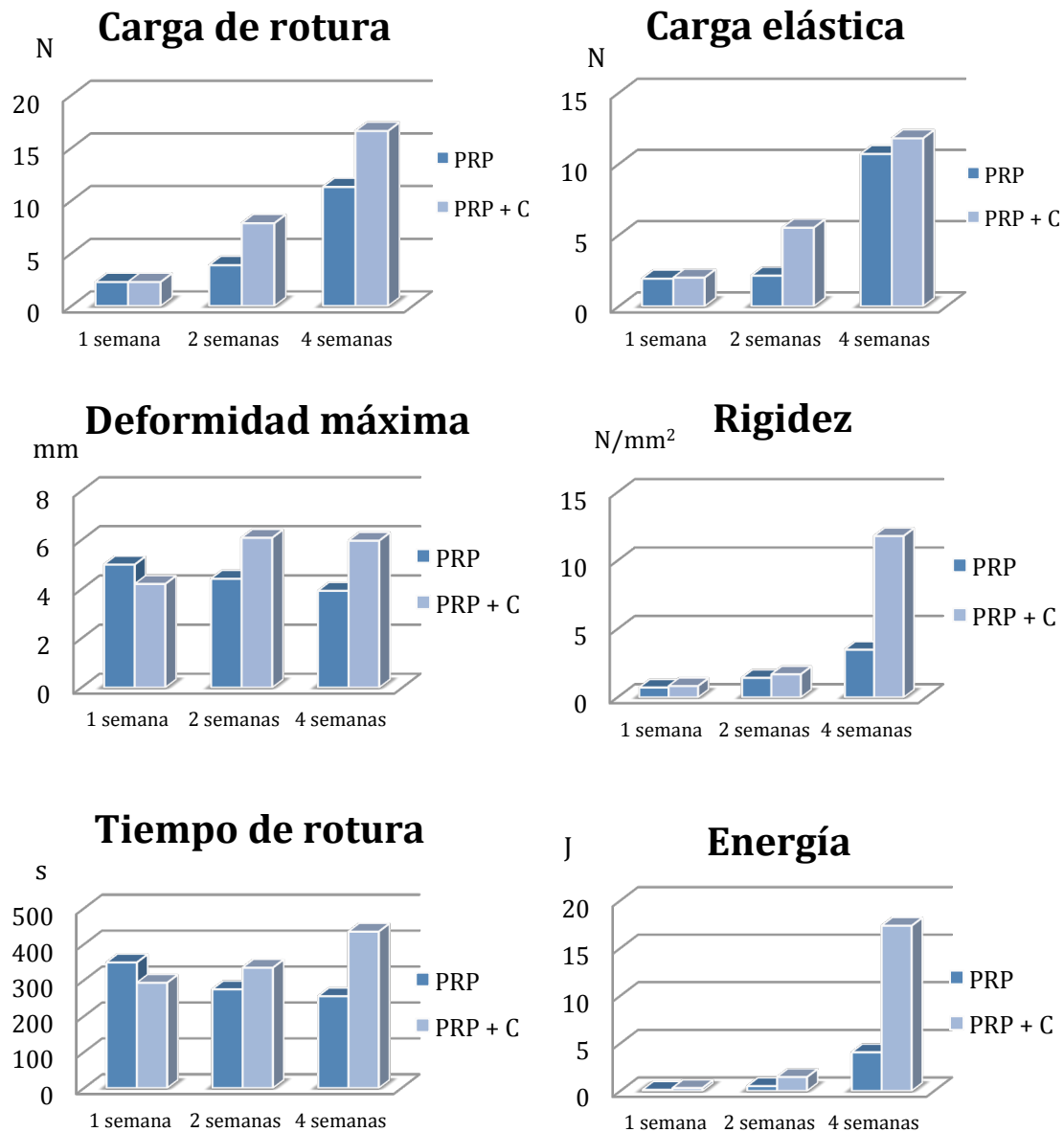


Imagen 24. Representación en forma de diagrama de barras de los resultados del análisis biomecánico.

ii) Análisis en función del tiempo

Se analizaron los resultados de cada variable: carga de rotura, carga elástica, deformidad máxima, rigidez, tiempo de rotura y energía, comparando los resultados en función del tiempo.

Tabla de grupo PRP

Variable	Comparación	Media (DE)	Valor P
Carga rotura (N)	1S vs 2S	2,29 (0,68) / 3,89 (0,99)	0,100
	1S vs 4S	2,29 (0,68) / 11,31 (1,48)	0,100
	2S vs 4S	3,89 (0,99) / 11,31 (1,48)	0,100
Carga elástica (N)	1S vs 2S	1,95 (0,9) / 2,16 (0,91)	1,000
	1S vs 4S	2,16 (0,91) / 11,81 (1,14)	0,200
	2S vs 4S	2,16 (0,91) / 11,81 (1,14)	0,200
Deformidad máxima (mm)	1S vs 2S	5,01 (3,19) / 4,43 (2,2)	1,000
	1S vs 4S	5,01 (3,19) / 3,94 (0,77)	0,800
	2S vs 4S	4,43 (2,2) / 3,94 (0,77)	0,800
Rigidez (N/mm²)	1S vs 2S	0,73 (0,42) / 1,44 (0,74)	0,400
	1S vs 4S	0,73 (0,42) / 3,5 (1,61)	0,200
	2S vs 4S	1,44 (0,74) / 3,5 (1,61)	0,200
Tiempo rotura (s)	1S vs 2S	349,66 (207,13) / 274,84 (107,31)	0,700
	1S vs 4S	349,66 (207,13) / 255,72 (7,1)	0,800
	2S vs 4S	274,84 (107,31) / 255,72 (7,1)	0,800
Energía (J)	1S vs 2S	0,13 (0,06) / 0,52 (0,39)	0,100
	1S vs 4S	0,13 (0,06) / 4,07 (1,39)	0,200
	2S vs 4S	0,52 (0,39) / 4,07 (1,39)	0,200

Tabla 7. Análisis en función del tiempo del estudio biomecánico para el grupo de tratamiento con PRP

Tabla del grupo PRP y CMDL.

Variable	Comparación	Media (DE)	Valor P
Carga rotura (N)	1S vs 2S	2,29(0,89) / 7,87(2,18)	0,100
	1S vs 4S	2,29(0,89) / 16,62(6)	0,100
	2S vs 4S	7,87(2,18) / 16,62(6)	0,100
Carga elástica (N)	1S vs 2S	2,02 (0,98) / 5,53 (2,8)	0,200
	1S vs 4S	2,02 (0,98) / 11,81 (1,14)	0,200
	2S vs 4S	5,53 (2,8) / 11,81 (1,14)	0,100
Deformidad máxima (mm)	1S vs 2S	4,22 (3,03) / 6,1 (0,73)	0,400
	1S vs 4S	4,22 (3,03) / 5,98 (3,65)	0,800
	2S vs 4S	6,1 (0,73) / 5,98 (3,65)	0,700
Rigidez (N/mm²)	1S vs 2S	0,84 (0,27) / 1,7 (0,33)	0,200
	1S vs 4S	0,84 (0,27) / 19,2 (27,8)	0,200
	2S vs 4S	1,7 (0,33) / 19,2 (27,8)	0,100
Tiempo rotura (s)	1S vs 2S	293,12 (231,83) / 335,08 (180,11)	0,800
	1S vs 4S	293,12 (231,83) / 435,32 (250,53)	0,800
	2S vs 4S	335,08 (180,11) / 435,32 (250,53)	1,000
Energía (J)	1S vs 2S	0,32 (0,42) / 1,47 (1,06)	0,400
	1S vs 4S	0,32 (0,42) / 17,36 (18,16)	0,200
	2S vs 4S	1,47 (1,06) / 17,36 (18,16)	0,100

Tabla 8. Resultados del análisis en función del tiempo del estudio biomecánico para el grupo de tratamiento con PRP y CMDL.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis en función del tiempo.

3) Estudio histológico

a) Análisis macroscópico

En el estudio de las muestras a las 72 horas, se observó una solución de continuidad entre el húmero y la inserción tendinosa. A la semana, se observó una reparación incompleta y en los grupos de 2 y 4 semanas, una reparación completa.

b) Estadística descriptiva

i) Muestras a las 72 horas de la cirugía

En las primeras 72 horas, en ambos grupos se observa una reacción inflamatoria aguda típica, caracterizada por la presencia de edema, polimorfonucleares (de 4 a 15 células por campo de gran aumento) y vasos de pequeño tamaño, que en algún caso llegan a más de 13 microvasos por campo. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, si se observa una discreta mayor cantidad de vasos en el grupo con CMDL, 2,67 (0,58) frente a 2 (0) con una $p=0,188$.

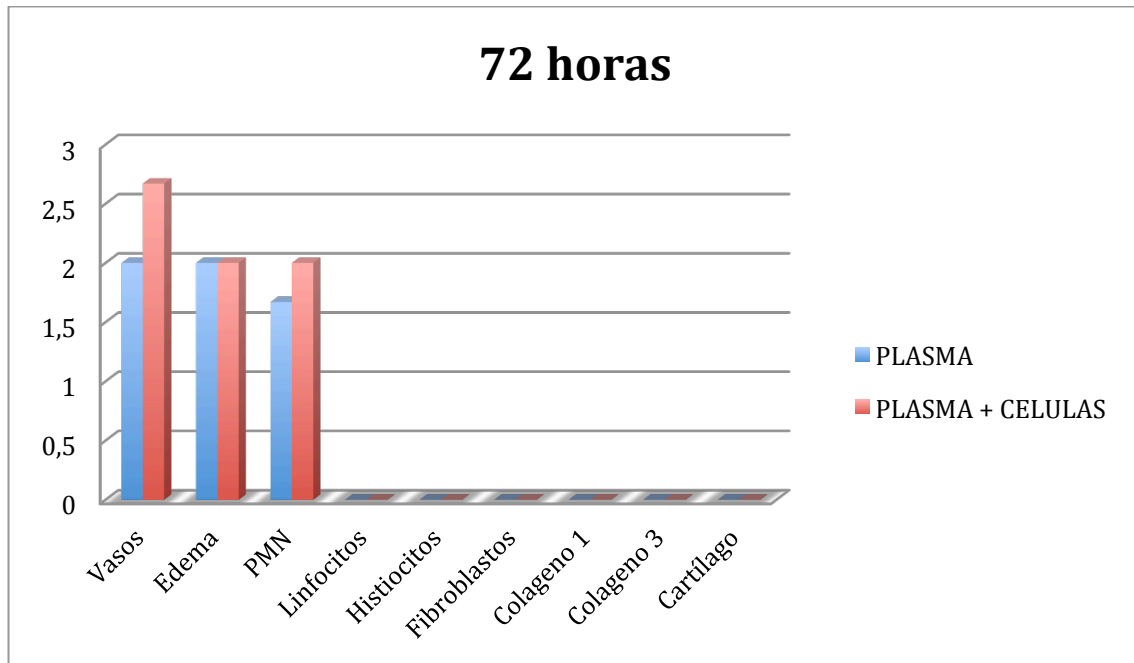


Imagen 25. Diagrama de barras que representa los hallazgos histológicos a las 72 horas del tratamiento.

ii) Muestras a la semana de la cirugía

Aunque se mantiene el patrón de inflamación aguda, ésta es menor que a las 72 horas. Además, comienzan a aparecer células inflamatorias: linfocitos, histiocitos y fibroblastos.

Al comparar ambos grupos de tratamiento, se observó que la concentración de vasos a la semana del tratamiento con PRP y células fue 2 (0) y 1 (0) en el grupo de tratamiento con PRP, Estas diferencias fueron estadísticamente significativas con una $p=0,047$. El colágeno tipo I aparece solo en el grupo de células 1 (0), siendo esta diferencia estadísticamente significativa con una $p=0,047$.

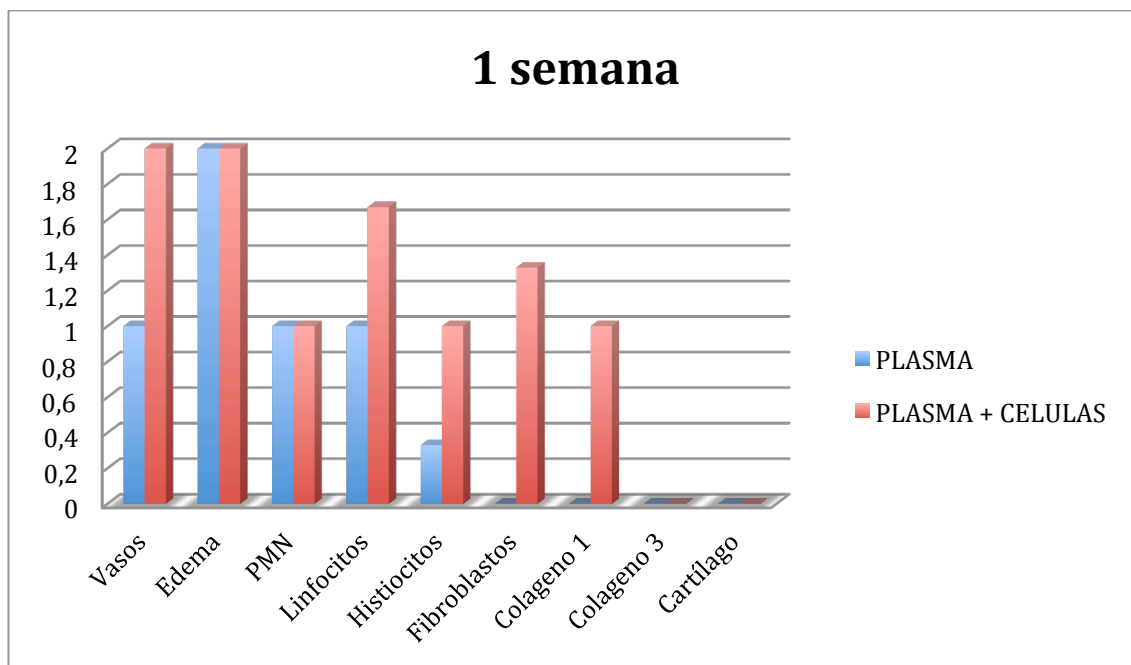


Imagen 26. Diagrama de barras que representa los hallazgos histológicos a la semana del tratamiento.

iii) Muestras a las 2 semanas de la cirugía

La presencia de vasos y edema disminuye considerablemente, hasta ser menor de 4 microvasos por campo de gran aumento en todos los casos. En el caso del edema, estas diferencias fueron estadísticamente significativas con una $p=0,047$, siendo la media del grupo de PRP y células 1 (0) y 0 (0) para el grupo de PRP.

Los PMN desaparecen completamente y aumentan las células de inflamación crónica: linfocitos, histiocitos y fibroblastos, observándose en mayor cantidad en el grupo con células. En el caso de los linfocitos estas diferencias fueron estadísticamente significativas con una $p=0,047$, siendo el valor medio del grupo células 2 (0) y 1 (0) el grupo sólo con PRP. Los fibroblastos sólo se observan en el grupo con células 1,33 (0,58), pudiendo observarse cierta tendencia a la significación ($p=0,059$).

Además, aparecen fibras de colágeno tipo I únicamente en el grupo de tratamiento con PRP y células 1 (0), siendo estadísticamente significativo con una $p=0,047$,

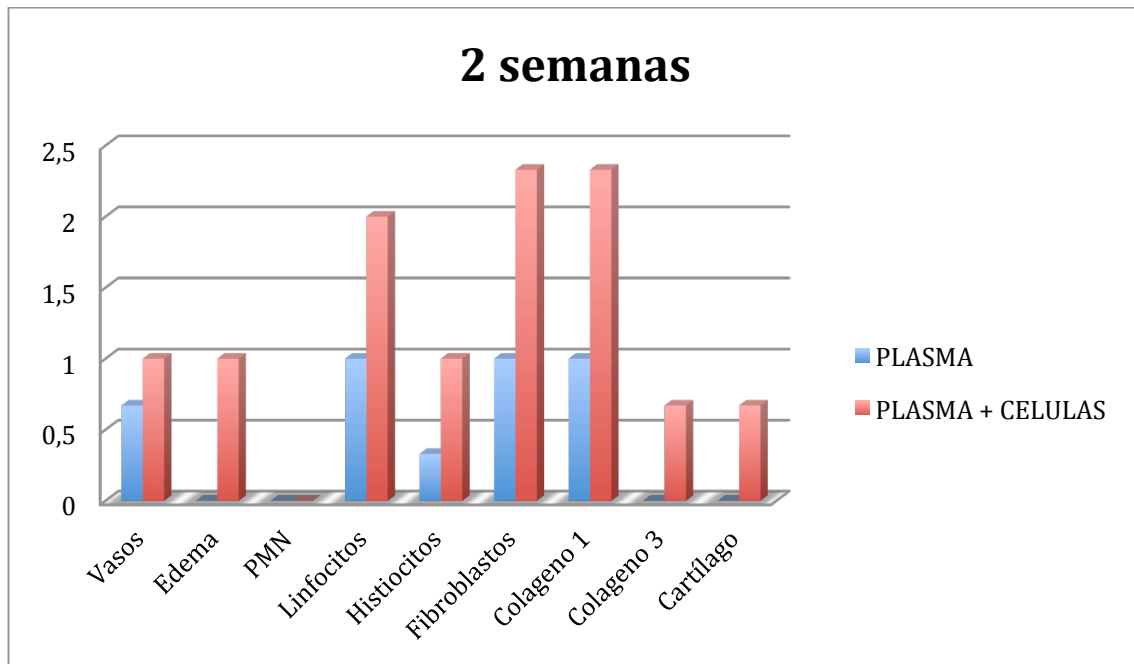


Imagen 27. Diagrama de barras que representa los hallazgos histológicos a las 2 semanas del tratamiento.

iv) Muestras a las 4 semanas de la cirugía

Los parámetros de inflamación aguda: vasos, edema y PMN han desaparecido. Únicamente el grupo de células tiene un valor medio de 1 (0) frente a 0 del grupo de PRP, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con un valor $p=0,47$.

Los fibroblastos aumentan levemente, siendo más frecuentes en el grupo con células.

Los linfocitos disminuyen en el grupo de células y aumentan en el grupo con PRP, siendo ahora más frecuentes en el grupo de PRP 2 (0) respecto a 1(0) en el PRP y células. Esta diferencia fue estadísticamente significativa con una $p=0,047$.

Aumenta considerablemente el colágeno tipo I y III y el cartílago, siendo en los 3 casos más abundantes en el grupo de PRP y células. Tanto el colágeno tipo I como el cartílago muestran una tendencia a la significación: el colágeno tipo I tiene un valor medio en el grupo de células de 3 (0) frente a 1,67 (0,58) en el grupo de PRP, con una $p=0,059$. El cartílago es mucho más abundante en el grupo con células 2,67 (0,58) respecto al grupo de PRP 0,33 (0,58), con una $p=0,072$ cercana a la significación.

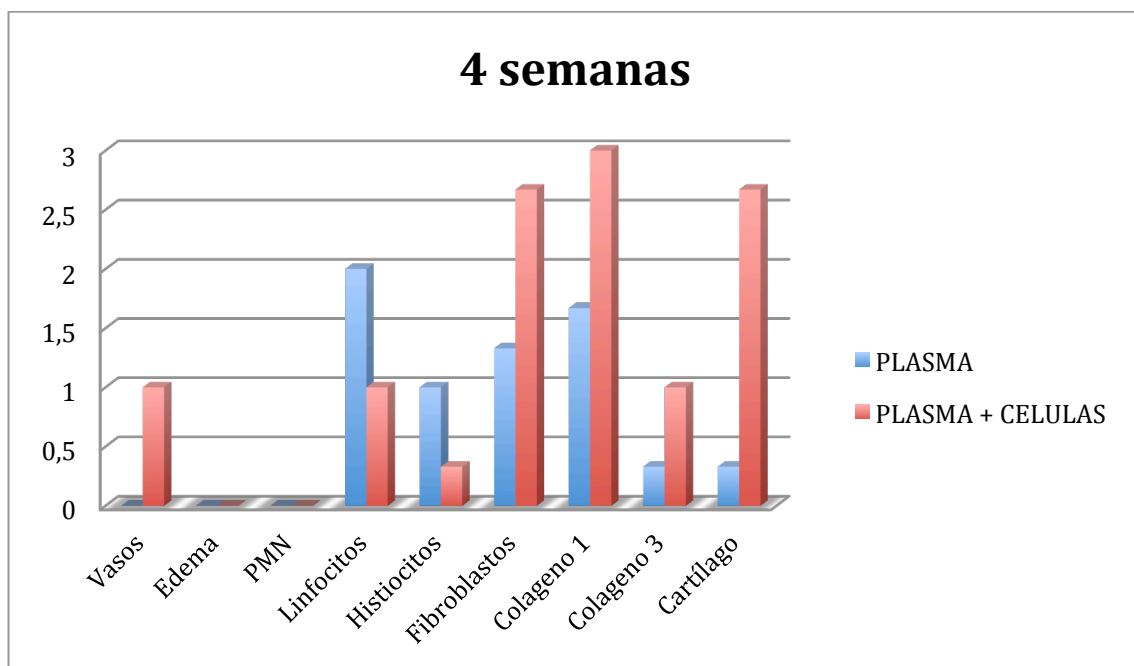


Imagen 28. Diagrama de barras que representa los hallazgos histológicos a las 4 semanas del tratamiento.

c) Estadística inferencial

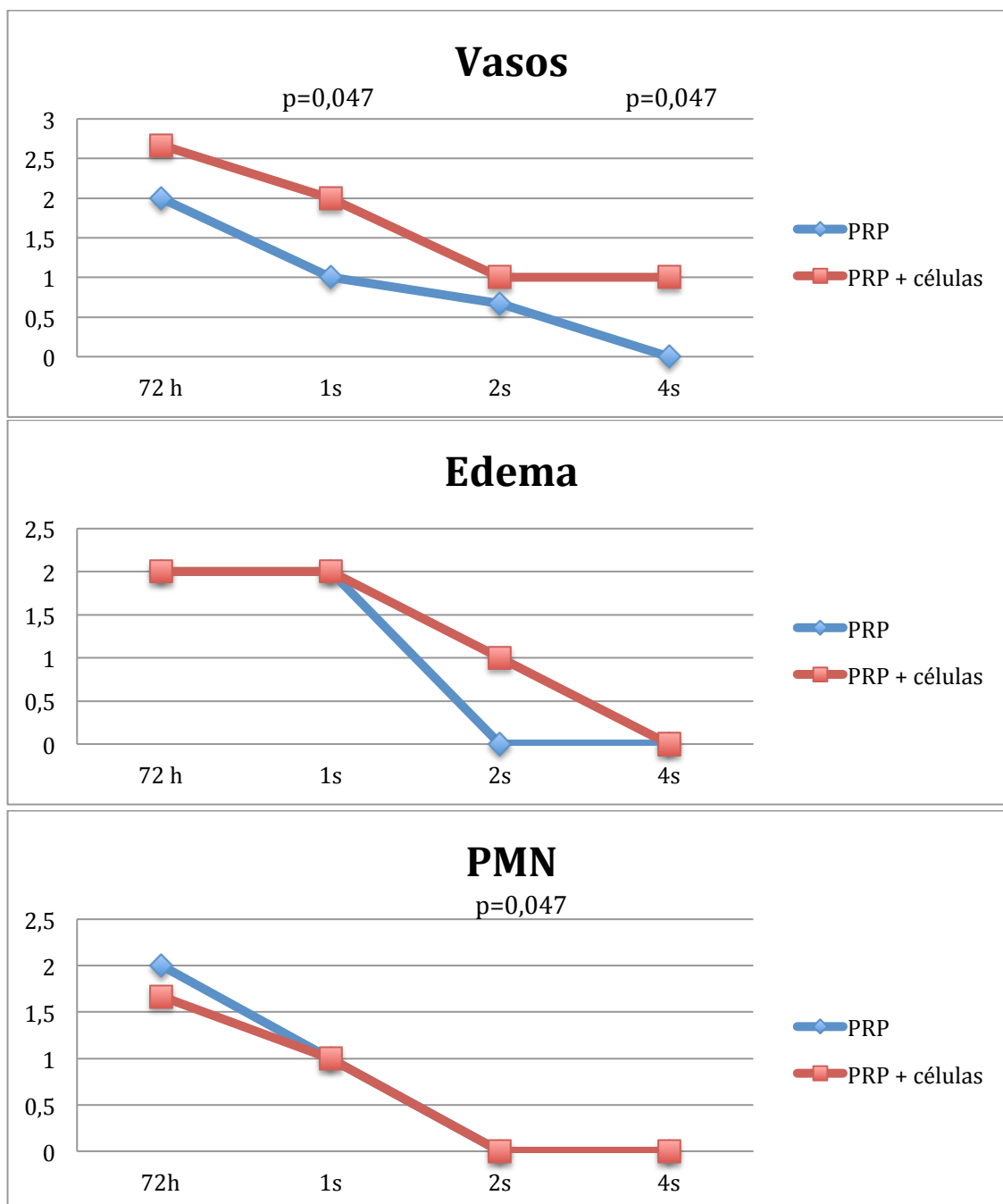
i) Análisis en función del tratamiento

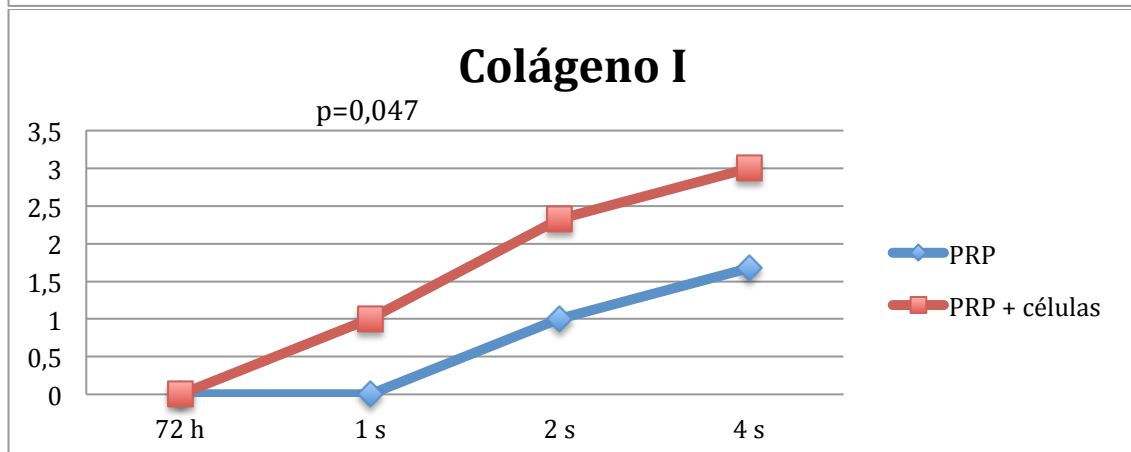
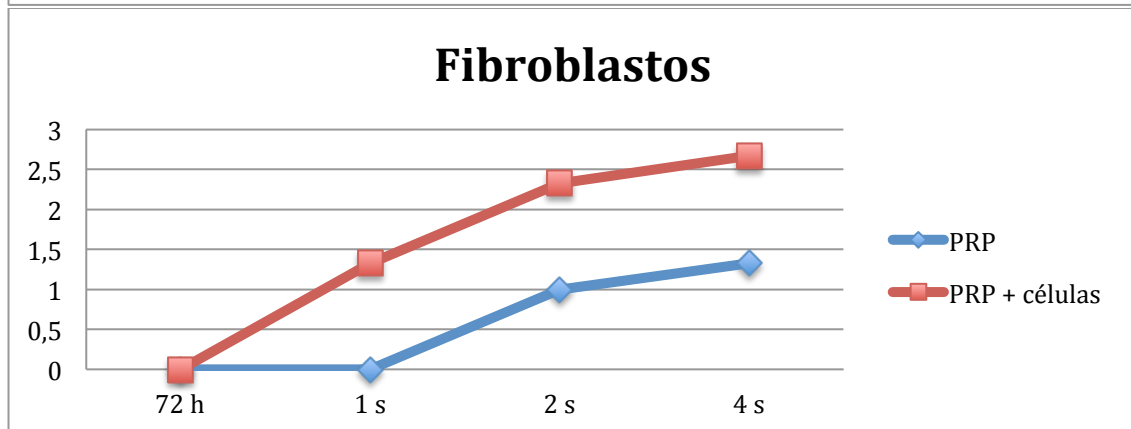
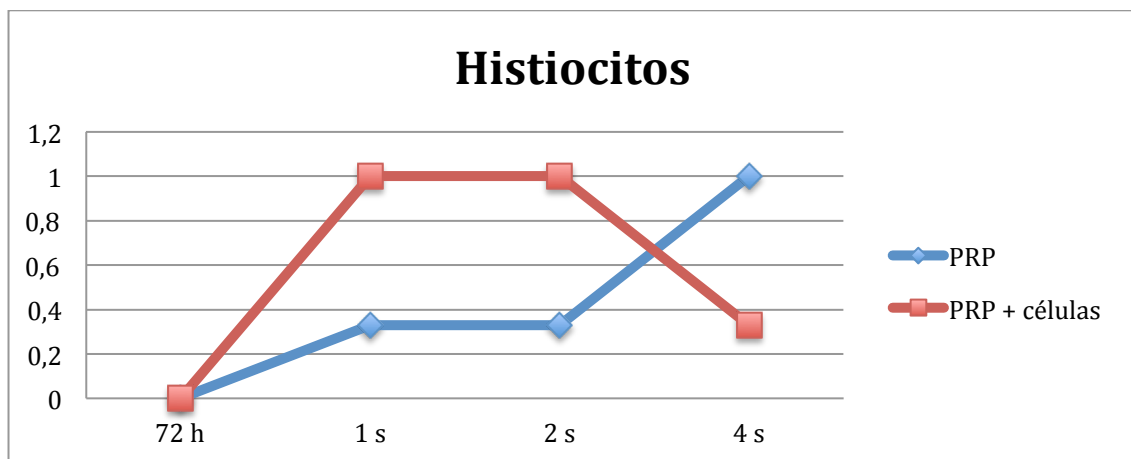
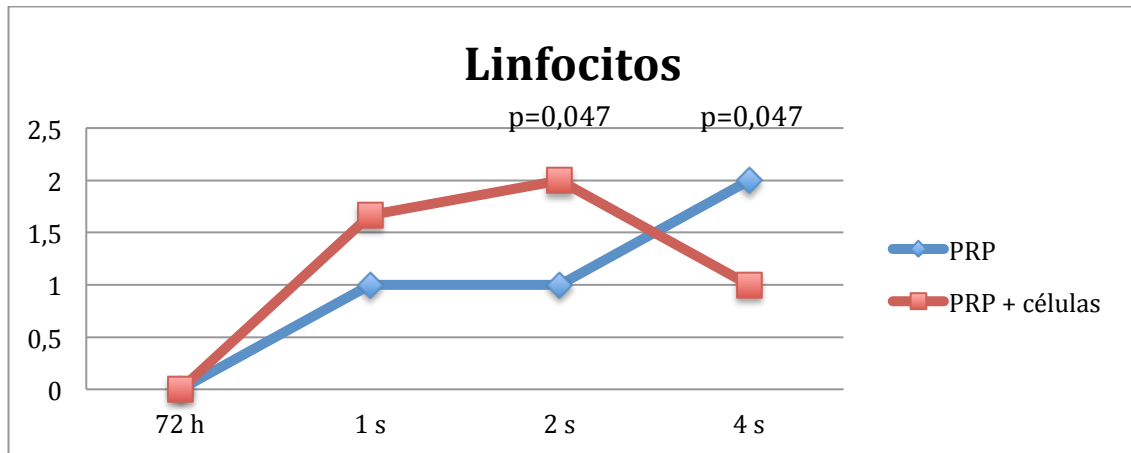
Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 9:

	TIEMPO	PRP	PLASMA + CÉLULAS	VALOR p
		Media (DS)	Media (DS)	
VASOS	72 h	2 (0)	2,67 (0,58)	0,188
	1 s	1 (0)	2 (0)	0,047*
	2 s	0,67 (0,58)	1 (0)	0,505
	4 s	0 (0)	1 (0)	0,047*
EDEMA	72 h	2 (0)	2 (0)	NP
	1 s	2 (0)	2 (0)	NP
	2 s	0 (0)	1 (0)	0,047*
	4 s	0 (0)	0 (0)	NP
PMN	72 h	1,67 (0,58)	2 (0)	0,505
	1 s	1 (0)	1 (0)	NP
	2 s	0 (0)	0 (0)	NP
	4 s	0 (0)	0 (0)	NP
LINFOCITOS	72 h	0 (0)	0 (0)	NP
	1 s	1 (0)	1,67 (0,58)	0,188
	2 s	1 (0)	2 (0)	0,047*
	4 s	2 (0)	1 (0)	0,047*
HISTIOCIDIOS	72 h	0 (0)	0 (0)	NP
	1 s	0,33 (0,58)	1 (0)	0,188
	2 s	0,33 (0,58)	1 (0)	0,188
	4 s	1 (0)	0,33 (0,58)	0,188
FIBROBLASTOS	72 h	0 (0)	0 (0)	NP
	1 s	0 (0)	1,33 (0,58)	0,059
	2 s	1 (0)	2,33 (0,58)	0,059
	4 s	1,33 (0,58)	2,67 (0,58)	0,11
COLÁGENO I	72 h	0 (0)	0 (0)	NP
	1 s	0 (0)	1 (0)	0,047*
	2 s	1 (0)	2,33 (0,58)	0,059
	4 s	1,67 (0,58)	3 (0)	0,059
COLÁGENO III	72 h	0 (0)	0 (0)	NP
	1 s	0 (0)	0 (0)	NP
	2 s	0 (0)	0,67 (0,58)	0,188
	4 s	0,33 (0,58)	1 (0)	0,188
CARTÍLAGO	72 h	0 (0)	0 (0)	NP
	1 s	0 (0)	0 (0)	NP
	2 s	0 (0)	0,67 (0,58)	0,188
	4 s	0,33 (0,58)	2,67 (0,58)	0,072

Tabla 9. Análisis estadístico en función del tratamiento en los distintos tiempos de sacrificio. (*, resultado estadísticamente significativo)

A continuación, se muestran en forma de líneas la evolución temporal de los 2 grupos de tratamiento.





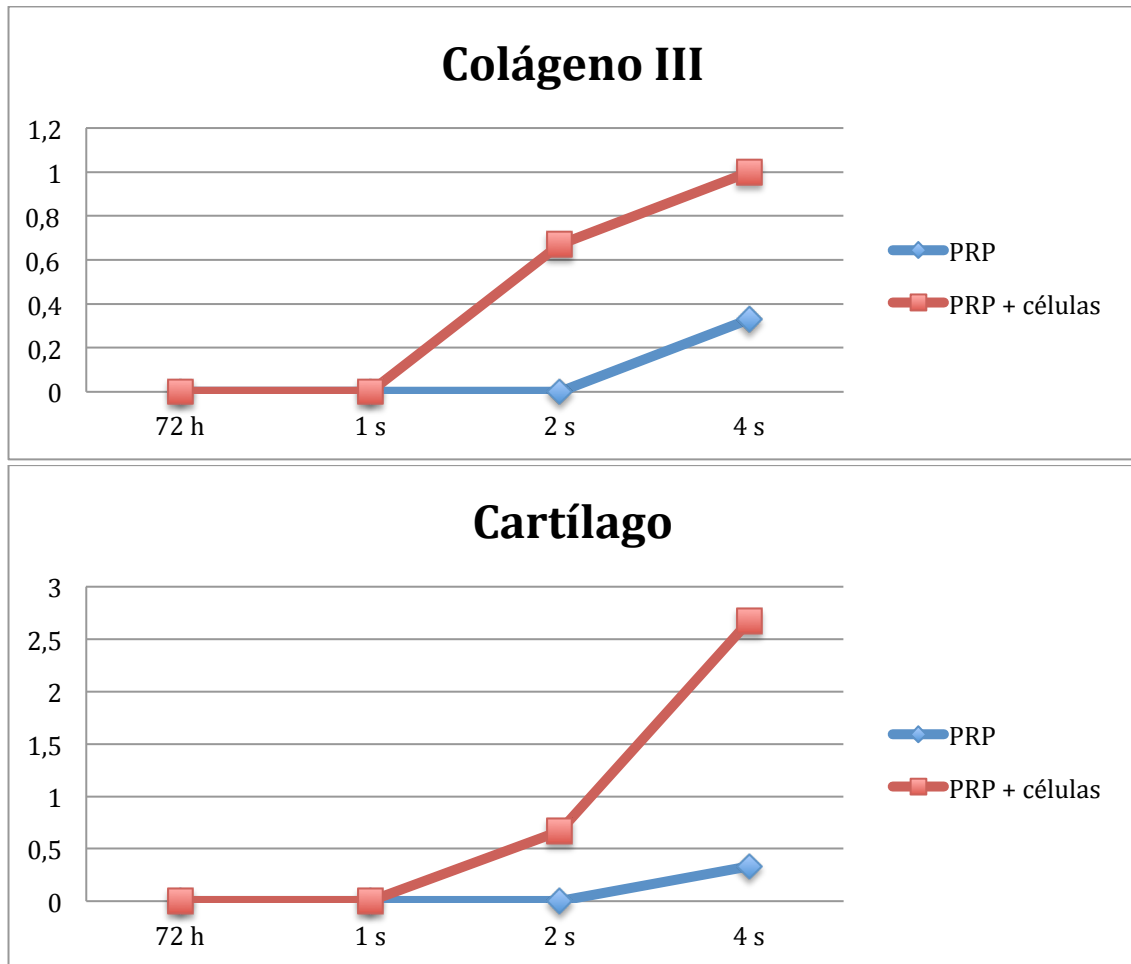


Imagen 29. Representación en forma de líneas de la evolución temporal de los 2 grupos de tratamiento.

ii) Análisis de tendencia temporal.

Para valorar la evolución según el tiempo en ambos grupos de tratamiento, se utilizó una estimación de tendencias temporales del cambio medio semanal (tabla 10).

	MUESTRA	COEFICIENTE	IC (95 %)		VALOR p
VASOS	Global	- 0,464	- 0,645	- 0,283	< 0,001*
	PRP	- 0,490	- 0,679	- 0,301	< 0,001*
	PRP + Células	- 0,438	- 0,671	- 0,206	0,002*
EDEMA	Global	- 0,609	- 0,745	- 0,473	< 0,001*
	PRP	- 0,619	- 0,899	- 0,338	< 0,001*
	PRP + Células	- 0,599	- 0,679	- 0,519	< 0,001*
PMN	Global	- 0,471	- 0,621	- 0,320	< 0,001*
	PRP	- 0,483	- 0,671	- 0,206	0,002*
	PRP + Células	- 0,503	- 0,746	- 0,259	0,001*
LINFOCITOS	Global	0,309	0,104	0,515	0,005*
	PRP	0,483	0,348	0,619	< 0,001*
	PRP + Células	0,135	- 0,268	0,539	0,470
HISTIOCITOS	Global	0,129	- 0,023	0,281	0,093
	PRP	0,258	0,078	0,468	0,010*
	PRP + Células	0	- 0,256	0,256	1
FIBROBLASTOS	Global	0,535	0,294	0,776	< 0,001*
	PRP	0,406	0,238	0,574	< 0,001*
	PRP + Células	0,664	0,324	1,003	0,001*
COLÁGENO I	Global	0,651	0,443	0,859	< 0,001*
	PRP	0,503	0,348	0,657	< 0,001*
	PRP + Células	0,799	0,551	1,048	< 0,001*
COLÁGENO III	Global	0,2	0,090	0,310	0,001*
	PRP	0,097	- 0,029	0,223	0,118
	PRP + Células	0,303	0,162	0,444	< 0,001*
CARTÍLAGO	Global	0,442	0,218	0,665	< 0,001*
	PRP	0,097	- 0,029	0,223	0,119
	PRP + Células	0,786	0,577	0,996	< 0,001*

Tabla 10. Resultados del análisis de tendencia temporal del estudio histológico (*, resultado estadísticamente significativo).

Tal y como se observa en la tabla 10, la concentración de vasos, edema y PMN presenta un coeficiente negativo, lo que refleja una tendencia a la disminución de los valores con el tiempo. Estos valores son muy similares y estadísticamente significativos en ambos grupos de tratamiento y en la muestra global.

En el estudio de linfocitos e histiocitos obtenemos un coeficiente positivo, suponiendo una tendencia temporal al incremento de la concentración de estos

grupos celulares. Destaca además, en el grupo de tratamiento con PRP, un coeficiente mayor y estadísticamente significativo.

En el caso de los fibroblastos y el colágeno tipo I existe una tendencia al aumento estadísticamente significativa en todos los grupos. Sin embargo, el coeficiente de tendencia temporal es mayor en el grupo de PRP + células en ambos casos. Por último, el colágeno tipo III y el cartílago muestran una tendencia temporal positiva, únicamente estadísticamente significativa en el grupo de tratamiento de PRP + células.

iii) Escala modificada de Watkins

En la tabla 11 se muestran los valores obtenidos en los distintos grupos en la escala de Watkins y su puntuación final. La puntuación máxima de la escala es 28, que equivaldría al máximo grado de similitud histológico con la entesis nativa.

Variables	72 h		1 semana		2 semanas		4 semanas	
	Sin CMDL	Con CMDL	Sin CMDL	Con CMDL	Sin CMDL	Con CMDL	Sin CMDL	Con CMDL
Celularidad	1	2	1	2	2	2	3	3
Tenocitos	1	1	1	2	2	3	3	4
Paralelismo de las células	1	1	1	1	2	3	3	4
Vascularización	1	1	1	2	3	3	4	3
Fibras de gran diámetro	1	1	2	1	3	2	4	3
Paralelismo de las fibras	1	1	1	1	2	3	3	4
Aspecto de la inserción tendón-hueso	3	2,5	3	2	1,5	3,5	2	2
Puntuación final	9	9,5	10	11	15,5	19,5	22	23

Tabla 11. Resultados de la escala de Watkins.

5. DISCUSIÓN

La alta tasa de fracaso tras la reparación quirúrgica de las roturas de los tendones del manguito rotador, a pesar de las mejoras técnicas quirúrgicas, ha planteado la existencia de un problema biológico intrínseco del tendón⁵. La inserción del manguito rotador forma una compleja transición entre el tendón y el hueso con una estructura morfológica altamente especializada, denominada entesis⁸. Sabemos que la entesis no se regenera tras la reparación quirúrgica. En lugar de formar un tejido similar al nativo se produce un tejido fibrovascular, con menor resistencia mecánica, que puede predisponer a nuevas roturas⁸. Por tanto, conceptualmente las denominadas re-roturas no se deberían considerar nuevas roturas sino como una ausencia de cicatrización. Iannotti y cols.²³¹ demostraron mediante resonancia magnética que la mayor parte de lo que denominamos rerroturas ocurren entre las 6 y 26 semanas tras la cirugía, tras el período de inmovilización inicial. En la mayoría de los casos, estas roturas se producen sin un traumatismo, lo que hace pensar que la causa más probable de fallo sea un déficit de cicatrización. Además, la mayoría de los fracasos ocurren en la zona hueso-tendón o en la zona tendinosa propiamente dicha a través de las suturas²³² lo que también apoyaría la teoría de un problema biológico intrínseco en la cicatrización de los tendones.

En la actualidad, se debate si la cicatrización tras la reparación quirúrgica es importante para el resultado clínico del paciente. Como ya se comentó en la introducción numerosos estudios han mostrado mejoría en el dolor y en la percepción subjetiva de los resultados por el paciente independientemente de la cicatrización de la reparación^{63,68,69,76}. Sin embargo, las escalas que evalúan la

fuerza y la movilidad activa (Constant, UCLA) sí han demostrado una mayor mejoría en los casos de cicatrización del tendón^{64,66-69,72,76-80}.

Nosotros pensamos que la cicatrización es fundamental para un buen resultado clínico. En base a ello, planteamos la hipótesis de que la aplicación local de células troncales derivadas de lipoaspirado mejoraría la biología local de la cicatrización, lo cual se traduciría en una mayor resistencia biomecánica de la reparación, como consecuencia de una estructura histológica más parecida a la de la entesis original.

1) El animal de experimentación

El modelo murino es uno de los más empleados en la literatura para el estudio del manguito rotador²³³ y está considerado como el más apropiado debido a sus similitudes anatómicas y funcionales con el hombro humano. Soslowsky y cols²³⁴ realizaron un estudio en diferentes animales en los que evaluaron 34 variables esenciales para establecer un modelo de estudio animal del manguito rotador. De ellos, el que se consideró más adecuado fue la rata, debido a su similar anatomía y movilidad del hombro. En el humano, el tendón supraespinoso pasa bajo el arco formado por la coracoides, acromion y ligamento coracoacromial mientras que en la rata este arco se encuentra formado por la coracoides, clavícula y acromion, así como, los ligamentos que comunican estas estructuras.

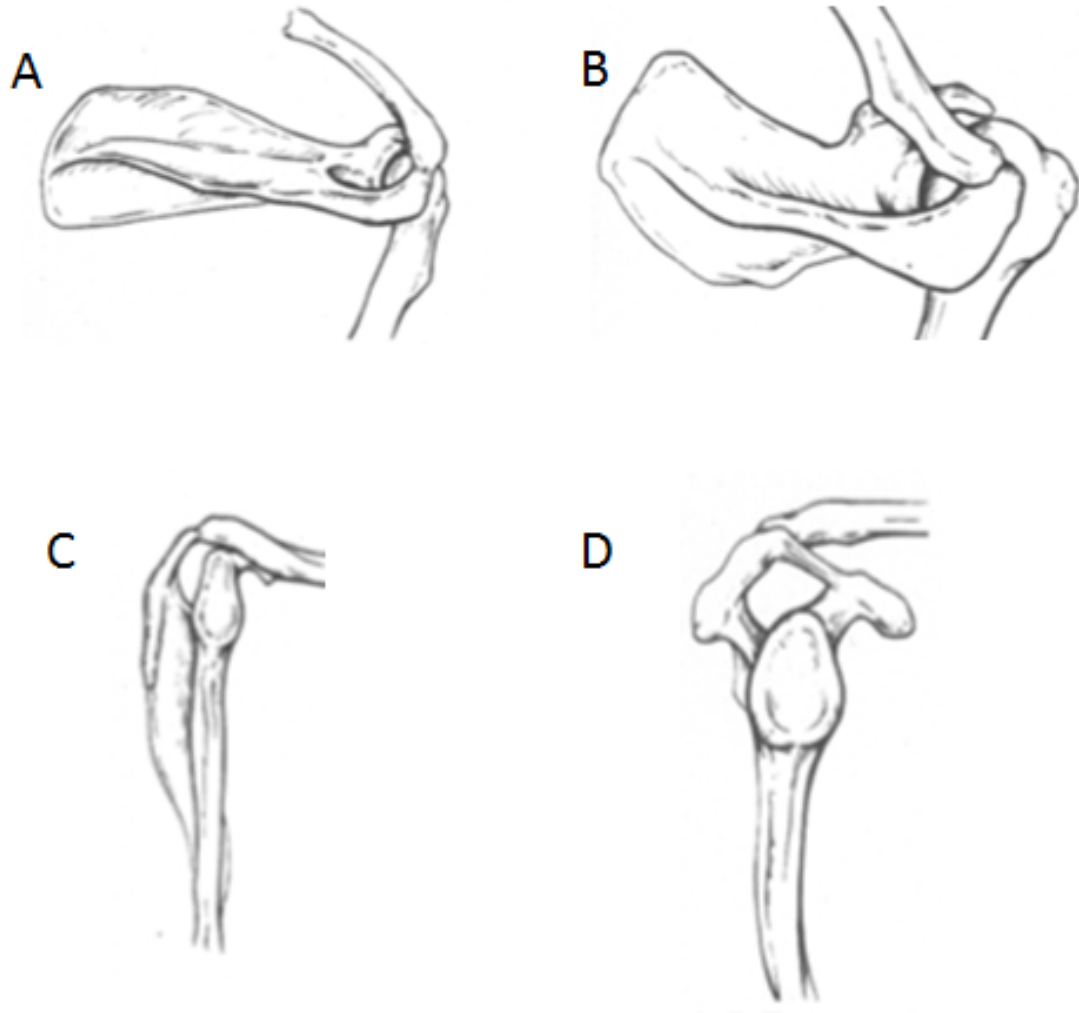


Imagen 30. Las imágenes A y B muestran una visión craneal de hombro de rata (A) y humano (B). Las imágenes C y D muestran una visión lateral sobre la glena de rata (C) y humano (D).

(Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. J Shoulder Elbow Surg 1996 Sep-Oct;5(5):383-392).

En nuestro estudio, se seleccionó el tendón supraespinoso, que es el que con más frecuencia se lesiona en humanos, siendo además el más citado en la literatura. El tendón supraespinoso de la rata es prominente y se inserta en el troquíter. Se diferencia claramente del infraespinoso por ser más posterior y mayor en tamaño, y del tendón largo del bíceps que es más anterior y de morfología tubular. Otros

autores han realizado modelos experimentales con el tendón del músculo infraespinoso¹¹⁸ o subescapular²¹⁷.

Estudios de actividad en ratas han demostrado movimientos similares a los que ocurren en el ser humano. Cuando el animal sube el brazo por encima de la cabeza para obtener el alimento, cuando corre o excava, el tendón supraespinoso se desliza bajo el arco acromial. Este movimiento de forma repetida predispone a sufrir lesiones similares a las ocurridas en el hombro humano. Soslowsly y cols.²³⁵ diseñaron un estudio experimental en el que sometían a un grupo de ratas a un sobreesfuerzo físico. Al comparar estos tendones con los del grupo control observaron que el tendón supraespinoso presentaba un aumento de celularidad y una pérdida de la orientación normal de las fibras de colágeno, similar a la que se aprecia en la tendinopatía humana.

Se han empleado otros modelos animales para el estudio de la patología del manguito rotador como el conejo^{236,237}, cabra^{238,239}, oveja^{240,241} y perro^{242,243}; pero anatómicamente divergen bastante del hombro humano en el acromion, la clavícula y la apófisis coracoides, que no cubren el manguito rotador mediante un arco.

El modelo murino tiene algunas desventajas. En primer lugar, debido al tamaño de la articulación del hombro es imposible emplear algunas técnicas de reparación humanas, como la artroscópica. Sin embargo, no consideramos que constituya un problema en nuestro trabajo, dado que los estudios que comparan la cirugía abierta y la artroscópica han mostrado resultados muy similares en las escalas funcionales y en la tasa de cicatrización de la entesis⁵⁹⁻⁶¹. Por ello, es de suponer

que el proceso de cicatrización de la entesis es independiente de la técnica empleada (cirugía abierta o artroscópica). Por otro lado, en los últimos años ha aumentado la utilización de suturas transóseas²⁴⁴, que mejoran la aposición del tendón sobre el hueso de forma similar a la sutura realizada en nuestro trabajo.

En la rata la placa de crecimiento puede no cerrarse de forma completa hasta la edad adulta y el riesgo de rotura del húmero por epifisiolisis es mayor que en otros animales²⁴⁵. En nuestro estudio no hubo ningún caso de fractura humeral durante el ensayo.

En las ratas la curación del tendón es más rápida que en los humanos, siendo posible a las 4 semanas observar un tejido en fase de maduración²¹⁵. A diferencia de los humanos, en las ratas se produce la curación espontánea de los tendones del hombro entre las 9²⁴⁶ y las 12 semanas de la lesión²³⁴. Esto podría suponer un problema a la hora de realizar estudios con tiempos de sacrificio más largos. En nuestro trabajo, el tiempo máximo de estudio fueron 4 semanas, garantizando así que la cicatrización no fuera espontánea.

2) El modelo experimental

En nuestro estudio hemos empleado un modelo de rotura aguda de manguito rotador, realizando una desinserción del tendón supraespinoso y sutura del mismo en un tiempo. Aunque este es el modelo más ampliamente utilizado en la literatura⁸, no es la situación más frecuente en la práctica clínica en humanos, donde la patología del manguito rotador suele ocurrir sobre un tendón previamente degenerado. Rodeo y cols.²⁴⁷ con una amplia experiencia en el estudio del modelo experimental agudo, defienden que tras la desinserción del

tendón la retracción que se produce, a pesar de la sutura, puede considerarse similar al humano. En su modelo animal, al igual que en el nuestro, las ratas no fueron inmovilizadas postoperatoriamente, de forma que durante la reparación se produjeron movimientos y pequeños espacios que se rellenaron de tejido cicatricial. Esto simularía la cicatrización en un tejido degenerado, haciendo del modelo agudo un modelo válido para el objetivo de nuestro estudio. Otros autores han desarrollado modelos de reparación crónica empleando inyecciones con toxina botulínica²⁴⁸ o lesionando el nervio supraescapular²⁴⁹. Sin embargo, requieren de dos cirugías secuenciales y son necesarios más trabajos para validar estos modelos.

Se utilizaron dos millones de CMDL en cada hombro intervenido de acuerdo con los protocolos de nuestro laboratorio de investigación. El número de células troncales empleadas por otros grupos investigadores es variable y depende del tipo de cirugía realizada y del animal de experimentación. Lim y cols²⁵⁰. utilizaron entre tres y cuatro millones de células troncales para recubrir injertos de ligamento cruzado anterior en conejos. Sin embargo, Gulotta y cols²¹⁵. utilizaron un millón de células troncales en su modelo experimental de manguito rotador. La justificación para este volumen celular es que el área de la zona de unión hueso-tendón en el modelo de manguito rotador en rata podía considerarse un 25%, con respecto a la de los túneles óseos femoral y tibial que se realizan en el modelo de ligamento cruzado anterior en conejos. Además, el peso medio de estos animales suele oscilar entre 2 y 3 kg, mientras que el de las ratas suele oscilar entre 250 y 350 gr. En cuanto a las CMDL, otros grupos investigadores como Pecanha y cols.²⁵¹ han utilizado este mismo número de células que se ha establecido como cifra de

referencia.

En dos trabajos previos, dentro de esta misma línea de investigación, se marcaron mediante inmunohistoquímica las CMDL vehiculizadas en un caso por esponja de colágeno²¹⁸ y en el otro por fibrina²¹⁹. Se demostró que se mantenían en el lugar de la reparación a la semana de su implantación. En base a estos hallazgos y a las propiedades vehiculizantes del coágulo de PRP descritas en la literatura, no se realizó ningún estudio específico para demostrar la presencia celular local.

En nuestro trabajo empleamos PRP sin leucocitos con una concentración entre 2 y 4 veces la basal, según el procedimiento descrito por Anitua²²⁸⁻²³⁰. Aunque la concentración ideal de plaquetas en el PRP es controvertida, los estudios describen los mejores resultados empleando concentraciones entre 2 y 6 veces la basal, no siendo efectivos por debajo de dos y con un efecto paradójico inhibitorio por encima de seis¹⁵⁵. Graziani y cols.¹⁵³ evaluaron el efecto in vitro de distintas concentraciones de PRP en osteoblastos y fibroblastos y determinaron que la concentración ideal de plaquetas era 2,5 veces la basal, resultando en un aumento de la proliferación celular estadísticamente significativo.

El efecto de los leucocitos en el PRP es también controvertido. Por un lado, se ha propuesto que la presencia de leucocitos constituye una fuente adicional de factores de crecimiento, además de tener propiedades antimicrobianas^{252,253}. Por otro lado, los leucocitos podrían liberar citocinas proinflamatorias que aumenten la inflamación y produzcan un efecto catabólico sobre el tejido^{252,254}. Estudios in vitro han demostrado daño directo mediado por neutrófilos a los miotubos²⁵⁵, sugiriendo que las MMP y los radicales libres producidos por los neutrófilos

podrían aumentar el daño tisular²⁵⁶. En un estudio posterior, Boswell y cols. analizaron la síntesis de colágeno en tendones flexores de caballos empleando distintas concentraciones²⁵⁷ de plaquetas y leucocitos. Estos autores observaron que los mejores resultados en la síntesis de colágeno se producían minimizando la concentración de leucocitos, siendo este factor más importante que una mayor concentración de plaquetas. Sin embargo, otros estudios han mostrado efectos antimicrobianos sin efectos inflamatorios indeseables en preparaciones con leucocitos^{258,259}. Aunque aún no está claro el efecto de los leucocitos en el PRP algunos autores recomiendan el uso de PRP y leucocitos para el tratamiento de heridas u otros tejidos donde se busque disminuir el riesgo de infección y PRP puro o sin leucocitos cuando queramos minimizar la inflamación y el tejido cicatricial¹⁵¹. Esto sería aplicable al tratamiento del manguito rotador, en el que es preferible un mayor estímulo anabólico, tal y como se da con el PRP puro, frente a un mayor efecto catabólico y antimicrobiano con el uso de PRP con leucocitos.

En nuestro trabajo empleamos PRP que había sido congelado a -20° C. El hecho de congelar el PRP provoca que las plaquetas se rompan y liberen sus factores de crecimiento. De esta forma, en lugar de producirse una liberación progresiva de los factores de crecimiento, se produce una liberación rápida. Algunos autores denominan a este PRP ya degranulado, agregado plaquetario o “platelet lysate”; pudiendo ser debido a un proceso previo de congelación o activación previa con trombina con cloruro cálcico. Aunque en muchos estudios se emplea PRP en fresco, existen numerosas publicaciones que emplean PRP congelado. Anitua y cols.²⁶⁰ realizaron un estudio en el que analizaban la cantidad y velocidad de liberación de PDGF, VEGF, HGF y IGF en PRP puro y PRP con leucocitos. Previo al análisis de las

muestras, éstas se congelaron a -80° C. Después, mediante técnica ELISA cuantificaron los factores de crecimiento presentes en el suero. Establecieron que el 70% de los factores se liberaban el primer día y el 30% restante durante la primera semana. De acuerdo a este estudio los factores de crecimiento estarían presentes a pesar del proceso de congelación, liberándose casi en su totalidad el primer día, por lo que el efecto sería muy parecido al de las muestras no congeladas.

Murphy y cols.²⁶¹ realizaron otro estudio en el que también cuantificaban la cantidad de PDGF, FGF, EFG y VEGF en distintas preparaciones de PRP que congelaban a -80°C . Al igual que Anitua y cols.²⁶⁰ pudieron cuantificar mediante técnica ELISA la concentración de factores de crecimiento. Resulta interesante que la mayor concentración se producía en las muestras en las que se añadió cloruro cálcico. También analizaron el efecto del PRP sobre células troncales derivadas de médula ósea y publicaron una mayor proliferación, migración e incluso mayor viabilidad tras criopreservación al emplear PRP frente a suero fetal bovino (FBS). El hecho de que el cloruro cálcico elevase más la concentración de factores de crecimiento hace pensar que no todas las plaquetas se han roto tras el proceso de congelación. Además, en este trabajo no sólo se identificaron los factores de crecimiento tras su congelación, también se determinó que éstos están activos e influyen sobre las células troncales. De la misma forma otros trabajos han empleado PRP que había sido congelado y han probado efectos estimulantes sobre las células troncales²⁶²⁻²⁶⁴.

En nuestro modelo, tras la cirugía no se inmovilizó el miembro intervenido, de forma similar a otros estudios^{8,118}. En general, en los humanos tras la cirugía de

reinserción del manguito rotador se inmoviliza el hombro, pero se permite la realización controlada de ejercicios pasivos durante las 6 primeras semanas para prevenir la rigidez⁵⁵. La incapacidad para controlar la movilidad postoperatoria en los modelos animales podría dificultar la extrapolación de los resultados. Sin embargo, durante el postoperatorio inmediato se puede observar como el animal camina sin apoyar el miembro intervenido y de forma progresiva va iniciando el apoyo. De esta forma, es el propio animal quien restablece su actividad cuando el dolor disminuye y con él la fase más aguda de la inflamación. Algunos autores han empleado inmovilizaciones de manguito rotador en ratas como Peltz y cols.¹¹⁶. Sin embargo, su uso no se ha extendido. El mismo autor realizó un estudio donde comparaba la inmovilización de hombro frente a una terapia de ejercicios pasivos en ratas tras sutura del tendón supraespinoso. Los resultados fueron que el grupo de terapia pasiva tenía una movilidad disminuida a las 2 y 4 semanas en comparación con el grupo que había sido inmovilizado. Parece que permitir que el propio animal se mueva y limite la actividad según su dolor es beneficioso comparado con el estrés que le supone al animal la inmovilización constante o las sesiones repetidas de movilización pasiva.

Los tiempos de estudio empleados para el análisis histológico fueron 3 días, 1, 2 y 4 semanas y para el estudio biomecánico, 1, 2 y 4 semanas. Estos tiempos son similares a los empleados por Bedi y cols.¹³⁸ que utilizan 5 días, 8 días, 2 y 4 semanas. Los intervalos de estudio para el análisis histológico tenían el objetivo de detectar los cambios histológicos que se producían de forma precoz con el uso de CMDL y PRP y ver su correspondencia biomecánica. No se emplearon tiempos más prolongados porque, a partir de las 8-9 semanas el tendón de la rata se regenera

de forma completa, incluso sin suturar²⁴⁶. Por tanto, no sería valorable si la cicatrización del tendón es debida a nuestro tratamiento o a la propia biología de la rata.

Existen numerosas escalas para la valoración de la reparación tendinosa, aunque ninguna de ellas ha sido todavía validada. En una revisión bibliográfica, Loppini y cols.²⁶⁵ señalaron, que la escala modificada de Watkins era adecuada para la evaluación de la reparación tendinosa. Aunque esta escala se describió originalmente para evaluar roturas tendinosas y tendinopatías, posteriormente Yokoya y cols.²⁶⁶ la modificaron para valorar la regeneración de tendón infraespinoso en conejo. Ide y cols.¹³⁰ en 2009 la emplearon para evaluar la regeneración del manguito rotador en un modelo murino, de forma equiparable a nuestro trabajo. La escala recoge múltiples parámetros de importancia para la integridad tendinosa y permite comparar los resultados de forma más objetiva.

3) Bioseguridad del PRP y CMDL.

Debido a su naturaleza autóloga, el PRP es de forma inherente seguro y libre de riesgo de transmisión de enfermedades como el VIH, hepatitis, etc. A pesar de ello, debido a su amplio uso se ha comenzado a cuestionar su seguridad. Algunos autores han sugerido que el PRP podría favorecer el crecimiento de bacterias al ser un derivado sanguíneo como el medio de cultivo agar sangre²⁶⁷. Sin embargo, el PRP es idéntico a la porción de sangre que forma el coágulo sanguíneo en las heridas y por tanto podría favorecer el crecimiento bacteriano tanto como cualquier coágulo sanguíneo. Además, el PRP puede tener propiedades antimicrobianas en el caso de contener leucocitos^{252,253}.

En los años 90 se observó que la activación del PRP, usando trombina bovina, podía provocar el desarrollo de anticuerpos antitrombina bovina, que reaccionaban de forma cruzada con la trombina humana, pudiendo provocar hemorragias²⁶⁸⁻²⁷⁰. Sin embargo, actualmente con la mejoría en las técnicas de producción de trombina exógena y la implantación del PRP, una vez formado el coágulo, parece que este riesgo se ha eliminado prácticamente. El método de Anitua, utilizado en nuestro trabajo, emplea para la activación del PRP cloruro cálcico, eliminando así cualquier riesgo derivado del uso de trombina.

Para finalizar, la esterilidad puede ser difícil de mantener durante la preparación del PRP²⁶⁷. En nuestro caso, todas las muestras se procesaron bajo campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Sólo hubo dos casos de infección de herida y fueron superficiales, sin afectar al manguito, por lo que es de suponer que la infección se produjo de fuera a dentro, no existiendo relación con la implantación intraarticular de PRP.

Respecto a la utilización de CMDL, las células troncales más empleadas en la práctica clínica son las derivadas de médula ósea. Sin embargo, su proceso de obtención es más doloroso para el paciente que el lipoaspirado con el que se obtienen las CMDL¹⁸⁷. Además, un gramo de tejido adiposo proporciona 5000 células troncales mesenquimales, 500 veces más que el número de células madre mesenquimales que se pueden obtener de un gramo de médula ósea²⁷¹. Por lo tanto, el tejido graso puede ser considerado una fuente rica en células troncales con menor morbilidad para el paciente en el caso de que se aplique en humanos. El proceso de preparación de CMDL es también más sencillo que el de MSC, lo que

constituye una ventaja adicional.

Las CMDL se utilizan de forma generalizada. Numerosos ensayos clínicos a nivel internacional y nacional han demostrado su bioseguridad^{198,206,209,213}. Así mismo, en los estudios realizados en nuestro laboratorio no se han descrito complicaciones relacionadas con el uso de CMDL.

Rubio y cols.²⁷² publicaron, por primera vez, la transformación neoplásica de las CMDL en un modelo experimental de ratón. Esta transformación neoplásica *in vitro* se produjo en cultivos en los que se permitió el crecimiento más allá de la subconfluencia, manteniéndolos más de dos meses después del aislamiento celular. En estas células se demostró la transformación neoplásica mediante el estudio del cariotipo, que confirmó la existencia de cambios en el ADN. Se observó además, que eran células de crecimiento anómalo o no controlado, capaces de desarrollar tumores al inocularse en ratones inmunodeprimidos. Sin embargo, cuando se cultivaron CMDL, evitando el crecimiento más allá del 85% de confluencia celular, no se encontraron alteraciones del ADN ni capacidad de inducir la formación de tumores en animales inmunodeprimidos. Ninguno de los grupos internacionales, que trabajan con CMDL, han comunicado complicaciones de este tipo, ni han sido capaces de reproducir los resultados de Rubio y cols. En 2010, 5 de los 7 autores del artículo original comunicaron la incapacidad de reproducir esos resultados y demostraron que el hallazgo se debió a la contaminación de las CMDL con una línea celular tumoral HT1080 siendo por tanto el artículo rechazado²⁷³. Estos datos avalan la posibilidad de aplicación de este tipo de terapia en seres humanos y, por tanto, la aplicabilidad de nuestro

modelo experimental. En nuestro estudio, tampoco hemos encontrado ningún dato que induzca a pensar en la transformación neoplásica si bien los tiempos de seguimiento son cortos.

4) Interpretación de los resultados

En este trabajo se ha realizado la aplicación local de CMDL y PRP para mejorar la histología de la entesis y la calidad del tejido de reparación. Para objetivar dicha mejoría también se midieron las propiedades biomecánicas del tendón.

Las cargas de rotura a la semana fueron muy similares entre ambos grupos (2,29 N). Sin embargo, a las 2 semanas, la carga de rotura media fue mayor en el grupo de PRP y células que en el grupo de PRP aislado (7,87 N (+/-2,66) vs 3,89 N (+/-0,99), $p=0,05$). Estas diferencias se mantuvieron a las 4 semanas a favor del grupo con células (16,62 N frente a 11,31 N, $p=0,12$). La disminución de las diferencias con el paso del tiempo es un hallazgo esperable. El tendón de la rata es capaz de regenerarse en todos los casos, independientemente del tratamiento. Buchmann y cols.²⁴⁶ en un trabajo con ratas Sprague-Dawley realizaron la desinserción del tendón supraespinoso sin sutura posterior y observaron que a las 9 semanas el 73% de los especímenes tenían un tendón completamente cicatrizado con escasa atrofia muscular. La capacidad de autorreparación del tendón de las ratas podría explicar como las diferencias iniciales disminuyen con el paso del tiempo hasta cicatrizar en todos los casos; de esta forma es esperable, que según avance el tiempo tras la lesión las diferencias entre distintos grupos de tratamiento se vayan minimizando.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los demás

parámetros del estudio biomecánico, es interesante reseñar que la carga elástica se modifica con el tiempo de forma similar a la carga de rotura. Los valores a la semana y a las 4 semanas fueron similares en ambos grupos, existiendo las mayores diferencias a las 2 semanas entre el grupo con PRP y PRP con aporte celular (2,16 N vs. 5,53 N, $p=0,127$). Estos mismos hallazgos fueron observados por Valencia y cols.²¹⁸ en otro trabajo que empleaba CMDL vehiculizadas en esponja de fibrina. Esto podría suponer que los tendones reparados con CMDL y PRP no son sólo más resistentes a las 2 semanas, sino también más elásticos, pareciéndose así más al tendón nativo.

Respecto al análisis histológico, en ninguno de los casos estudiados, con o sin CMDL, la entesis se regeneró por completo tras la reparación quirúrgica. El tendón fue sustituido por un tejido cicatricial, más desorganizado y celular al principio (72 horas), para aparecer un tejido conjuntivo denso, casi regular, a las 4 semanas pero sin llegar a tener las características histológicas de un tendón nativo. En todos los casos el tendón cicatrizado fracasó a nivel de la sutura en la unión hueso-tendón. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Gulotta y cols²¹⁵. Estos realizaron un estudio en el que comparaban dos grupos de ratas, realizando sutura del supraespinoso con aporte de BM-MSc o sutura sin aporte celular. Al igual que en nuestro trabajo, todas las muestras fracasaron en la unión hueso-tendón.

Llama la atención como en todos los tiempos de tratamiento, la vascularización fue mayor en el grupo con CMDL, siendo estadísticamente significativas estas diferencias a la semana y 4 semanas de la reparación. Estos hallazgos concuerdan con el efecto angiogénico de las MSC descrito ampliamente en la literatura^{206,274,275}.

Las fibras de colágeno estaban presentes en el 25% del tejido a la semana de la intervención y ausentes en las muestras con PRP ($p=0,047$). La concentración de colágeno aumentó de forma progresiva con el tiempo, siendo siempre mayor en el grupo con células. A las 2 y 4 semanas, esa diferencia se mantenía ($p=0,059$). Es importante destacar que las máximas diferencias se observaron a las 2 semanas, estando presente en un 60% del tejido con células y sólo en un 25% del tejido con PRP. El colágeno tipo I es el principal responsable de aportar resistencia en los tendones, siendo lógico que en nuestro estudio la densidad de fibras de colágeno fuese aumentando con el tiempo a la vez que la carga de rotura. El hecho de que las diferencias entre ambos grupos fueran mayores a las 2 semanas podría justificar que la carga de rotura fuera mayor y estadísticamente significativa en el grupo con aporte celular.

Se observaron también diferencias en la presencia de fibroblastos a la semana y 2 semanas a favor del grupo con aporte de CMDL ($p=0,059$). Los fibroblastos son los responsables de generar la matriz extracelular y producir colágeno, de forma que su mayor concentración en el grupo con CMDL justificaría las diferencias en la mayor presencia de fibras de colágeno en los tejidos con aporte de CMDL.

Los resultados de la escala modificada de Watkins también mostraron una destacada diferencia en los grupos a las 2 semanas. La puntuación total fue de 15,5 en el grupo con PRP y 19,5 en el grupo con células, siendo el resto de valores a las 72 horas, 1 semana y 4 semanas muy similares entre sí. Estos resultados confirmarían como el efecto de las células combinado con el PRP sobre el tendón es máximo a las 2 semanas para homogeneizarse a las 4 semanas. También pone de manifiesto como ambos tendones a las 4 semanas están lejos aún de parecerse

al tendón nativo, teniendo una puntuación de 22 el grupo con PRP y 23 el grupo con PRP y células.

Además de existir diferencias cuantitativas en la densidad de los vasos, células y fibras de colágeno en las muestras con aporte celular, se pueden observar diferencias temporales. A la semana de la cirugía sólo se observaron fibroblastos y fibras de colágeno en el grupo con CMDL, siendo desde entonces su concentración mayor en las muestras. De forma similar, a las 2 semanas aparecen fibras de colágeno tipo III y cartílago únicamente en las muestras con células, manteniendo su mayor concentración hasta la cuarta semana. Este hecho se estudió mediante tendencias temporales, observándose diferencias marcadas a favor del grupo con células. En el caso de los fibroblastos el valor fue 0,406 en el grupo de PRP y 0,664 en el grupo con CMDL, lo que representaría una tendencia mayor a su aparición en el grupo con células. De la misma forma, los valores para las fibras de colágeno tipo I fueron 0,503 en el grupo de PRP y 0,799 en el grupo con CMDL; para las fibras de colágeno tipo III fueron 0,097 y 0,303, respectivamente; y en el caso de cartílago fueron 0,097 y 0,786, respectivamente. Estos resultados apoyarían el efecto combinado estimulante de las CMDL y el PRP, que aceleraría la cicatrización en la entesis al producir una mayor y más precoz aparición de vasos, células y fibras de colágeno.

En base a estos resultados, se podría afirmar que a las 2 semanas existía una mayor resistencia mecánica ($p=0,05$) en el grupo con CMDL, representada por la carga de rotura, pudiendo justificarse por una mayor concentración de fibras de colágeno tipo I ($p=0,059$).

5) Comparación de nuestros resultados con los trabajos publicados

Se ha demostrado en numerosos estudios in vitro la sinergia entre las MSC y el PRP. Los estudios muestran una mayor proliferación y migración celular en medios de cultivo enriquecidos con PRP, en comparación con medio de cultivo estándar (suero fetal bovino)²⁷⁶⁻²⁷⁹.

D'Esposito y cols.²⁸⁰ realizaron un ensayo in vitro con células troncales derivadas de lipoaspirado y PRP humanas. Observaron una mayor viabilidad de las CMDL, proliferación y migración en el medio de cultivo con PRP. Murphy y cols.²⁶¹ observaron una mayor proliferación y migración celular y demostraron que el uso de PRP para la criopreservación de las células, era mejor que el medio de cultivo habitual, al aumentar el número de células viables tras congelación a -80°C. Suplementando el medio de cultivo con PRP, se ha observado una mayor viabilidad celular que podría ser debido al retraso en la aparición del fenotipo envejecido celular^{279,281} y a la protección frente a la inestabilidad cromosómica²⁸².

También se han observado buenos resultados favoreciendo la diferenciación de las MSC. Misha y cols.²⁸³ midieron la cantidad de ARN de marcadores condrogénicos (RUNX2) usando PRP y medio de cultivo estándar enriquecido con FBS, con resultados estadísticamente significativos a favor del PRP. Se han obtenido resultados similares para la diferenciación osteogénica²⁸⁴ y adipogénica^{277,285}. Respecto a la diferenciación tendinosa, Zhang y cols.²⁸⁶, en un estudio en conejos con células precursoras de tenocitos y agregado plaquetario, demostraron una mayor diferenciación hacia tenocitos maduros capaces de producir fibras de colágeno en el grupo en el que se añadieron plaquetas a las células precursoras de tenocitos.

A pesar de los buenos resultados mostrados por el PRP y las MSC in vitro, actualmente existe escasa información clínica relativa al uso combinado de PRP y MSC. Existen otros experimentos en animales, sin embargo, no hemos encontrado ningún otro trabajo que estudie el uso de PRP y células troncales en manguito rotador.

Chen y cols.²⁸⁷ estudiaron en tendón de Aquiles de rata la producción de proteínas de colágeno, comparando carga y descarga y añadiendo suero bovino fetal, PRP, células precursoras de tenocitos o la combinación de estos últimos. La descarga se realizó mediante inyección con toxina botulínica y, al grupo con carga, se le permitió movilidad libre. Publicaron mayor producción de proteínas de colágeno en los tendones sometidos a carga y en los tendones reparados con PRP y células. En otro trabajo en tendón de Aquiles de rata²⁸⁸ compararon PRP y PRP con CMDL tras reparación a las 4 semanas. La carga de rotura aumentó un 45% y la producción de colágeno tipo I fue un 68% mayor en el grupo con aporte celular. Ambos trabajos concuerdan con los resultados de nuestro trabajo indicando una sinergia entre el PRP y las células troncales.

Los avances en el estudio de la biología y biomecánica de los tendones del manguito rotador, junto con el desarrollo de las terapias biológicas, han permitido a los investigadores el uso de nuevas estrategias para mejorar la cicatrización tendinosa. El objetivo de las terapias biológicas es mejorar el entorno biológico en la zona de la reparación para restaurar la estructura de la inserción nativa. Los buenos resultados en los estudios con células troncales han promovido el estudio de terapias combinadas, en un intento de maximizar su efecto biológico. La terapia celular emplea células precursoras que se depositan en el lugar de la lesión. El uso

de vehículos con soporte estructural (“scaffolds”, en la bibliografía anglosajona) permite que las células alcancen y permanezcan en el lugar de la lesión. Por otro lado, algunos constituyen un suplemento mecánico para el tendón reparado. Para finalizar, los factores de crecimiento pueden modular el mecanismo de reparación de las células del tejido.

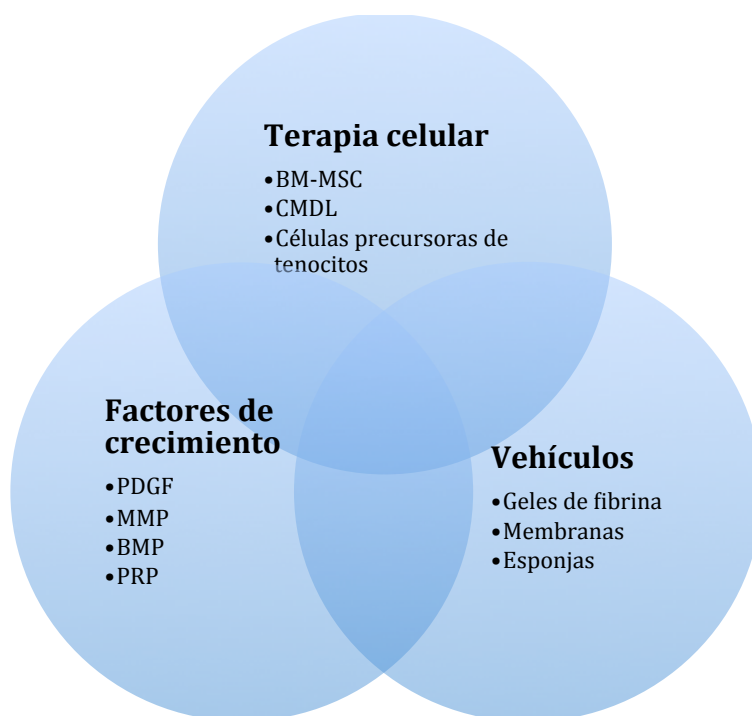


Imagen 31. Esquema que muestra las distintas terapias biológicas y sus combinaciones.

Tradicionalmente se han realizado estudios que emplean un único factor bioactivo, a diferencia de lo que ocurre naturalmente, donde la regeneración de los tejidos ésta mediada por un conjunto de moléculas y factores de crecimiento. El uso de un único factor de crecimiento para provocar una reparación fisiológica suele implicar dosis suprafisiológicas, con los correspondientes efectos adversos²⁸⁹. En consecuencia, algunos estudios recientes han explorado la eficacia de suplementar la terapia celular con factores de crecimiento naturales, como los derivados de

plaquetas. Éstos han demostrado in vitro efectos beneficiosos en el crecimiento, viabilidad, proliferación y diferenciación celular^{280,283,286}.

Debido a su fácil obtención, coste-efectividad y carácter autólogo, el uso de factores de crecimiento derivados de plaquetas constituye un campo de estudio con grandes posibilidades. El uso combinado de células troncales y PRP tiene una doble utilidad, por un lado, el PRP libera factores de crecimiento que pueden promover la activación celular y fomentar la curación del tendón en el lugar de la lesión y, por otro lado, debido a sus propiedades derivadas de la formación del coágulo de fibrina es capaz de actuar como vehículo para asegurar la implantación de las células en el lugar de la lesión. En el futuro, serán necesarios estudios de experimentación que confirmen la seguridad de estas terapias y analicen el beneficio obtenido con su aplicación en las lesiones del manguito rotador.

6. CONCLUSIONES

1. El modelo animal propuesto es reproducible y apropiado para estudiar el proceso de reparación del manguito rotador. Los estudios histológicos y biomecánicos permiten analizar la reparación tendinosa de forma adecuada.
2. La aplicación de PRP y CMDL, en el modelo de reparación del manguito rotador, mejora las propiedades biomecánicas de la reparación a las 2 semanas, representado por el aumento de la carga de rotura de los tendones sometidos a tracción.
3. La aplicación de PRP y CMDL, en el modelo de reparación del manguito rotador, mostró un aumento de fibras de colágeno a la semana y de la vascularización a la semana y 4 semanas.
4. El tejido reparado no se regeneró, en ningún caso, de forma similar a la entesis nativa.

7. RESUMEN

La existencia de rerroturas tras la reparación del manguito rotador continúa siendo un problema frecuente. La mayoría de lo que denominamos rerroturas se deben a la ausencia de cicatrización del tendón. Aunque algunos autores defienden que la función y satisfacción del paciente no depende de la integridad de la reparación, la mayor parte de los trabajos publicados más recientemente defienden que la ausencia de cicatrización constituye un factor pronóstico.

A pesar del desarrollo de las técnicas quirúrgicas y los implantes, el fracaso de las reparaciones sigue siendo elevado. La ausencia de cicatrización de los tendones pone de manifiesto un problema biológico. La entesis, una estructura altamente especializada en la inserción tendón-hueso, no se reproduce tras la sutura. En su lugar se forma un tejido cicatricial desorganizado con menor resistencia que la entesis nativa. Por ello, en los últimos años se han desarrollado terapias biológicas con el objetivo de mejorar el entorno biológico de la reparación y favorecer la regeneración de la entesis.

Las células troncales de origen mesenquimal han sido empleadas en traumatología para el tratamiento de fracturas, lesiones ligamentosas y tendinosas. Son capaces de diferenciarse en cualquier estirpe celular y producen señales que estimulan la migración celular y la vascularización. El plasma rico en plaquetas (PRP) tiene una alta concentración de factores de crecimiento. Además, al formar un coágulo, actúa como vehículo de las células y asegura su liberación en el lugar de la reparación.

La hipótesis de nuestro trabajo es que la aplicación local de células troncales derivadas de lipoaspirado (CMDL), asociadas al uso de PRP en un modelo de

manguito rotador animal, mejoraría la biología local de la cicatrización y la resistencia biomecánica del tendón, como consecuencia de una estructura histológica más parecida a la de la entesis original.

Para el estudio se emplearon 48 ratas Sprague Dawley con un peso comprendido entre 250 y 330 gramos y una edad aproximada de 8 semanas. Se emplearon 24 ratas en el estudio biomecánico y 24 en el estudio histológico. Se aleatorizaron en dos grupos de tratamiento: un grupo con CMDL + PRP y otro con PRP.

Las CMDL fueron extraídas del lipoaspirado del tejido subdérmico de otras dos ratas. Mediante disgregación mecánica y enzimática se seleccionaron las células troncales. Se caracterizaron con inmunofluorescencia y citometría de flujo y se diferenciaron a osteocitos y adipocitos para comprobar que no habían perdido la capacidad de diferenciación. Posteriormente, se expandieron las células en un medio adecuado y se criopreservaron. El día de la cirugía, se descongelaron a temperatura ambiente y se realizó un recuento celular previo a su implantación.

Para la obtención del plasma rico en plaquetas se realizó una punción intracardiaca percutánea en 2 ratas. La sangre se conservó en tubos citratados y se separó mediante centrifugación. Mediante pipeteado se aspiró la porción de plasma más cercana a la capa nucleada o "buffy coat". El plasma se dividió en alícuotas de 35 µl y se congeló a -20 °C durante un tiempo máximo de un mes. Previo a su implantación el plasma se descongeló a temperatura ambiente y se añadieron 2,1 µl de cloruro cálcico para neutralizar el citrato y la formación del coágulo.

A los animales se les realizó una incisión longitudinal sobre la pata delantera con

sección horizontal del deltoides, exponiendo el manguito rotador. Se desinsertó unilateralmente el tendón del supraespinoso y se suturó al troquíter a través de un túnel transóseo anteroposterior. Se utilizó una sutura irreabsorbible monofilamento de 5/0. En el primer grupo, se implantaron 2×10^6 células troncales embebidas en un coágulo de plasma rico en plaquetas y en el segundo grupo, únicamente el coágulo de plasma. El coágulo se depositó entre el tendón y el troquíter antes de apretar la sutura. Después, se realizó el cierre del deltoides y de la piel con sutura de seda 3/0.

En el estudio histológico los animales fueron sacrificados a los 3 días, 1, 2 y 4 semanas. Para su estudio se individualizó la escápula y miembro superior hasta codo y se fijó en una solución de folmaldehído al 4%. Posteriormente se descalcificaron con una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se efectuaron cortes en el eje longitudinal y coronal y se tiñeron usando técnicas morfométricas e inmunohistoquímicas. El estudio histológico lo realizó un patólogo que desconocía el grupo experimental al que pertenecía la muestra. Se valoró la inserción de la reparación tendón-hueso y se estudió la vascularización, celularidad y presencia de fibras de colágeno en la entesis.

En el estudio biomecánico los tiempos de sacrificio fueron 1, 2 y 4 semanas. Se individualizó la escápula, la unidad miotendinosa supraespinosa y el húmero. El húmero se introdujo en una jeringa de 1 ml y se fijó con cemento óseo de polimetilmetacrilato (Palacos® Zimmer). Se realizó un ensayo a tracción empleando una prensa electromecánica (Servosis®). Se consideró finalizado el ensayo cuando se observó clara rotura tendinosa asociada a un descenso brusco de

la tensión. Se valoraron la carga de rotura máxima, el lugar de la rotura, la carga elástica, la deformidad máxima, la rigidez, la energía y el tiempo de rotura.

Para el estudio de variables independientes y dependientes cuantitativas se empleó el test U de Mann Whitney. Para analizar el comportamiento de las variables en función del tiempo se utilizó un modelo de regresión lineal que analizaba la tendencia temporal semanal. En todos los casos, como grado de significación estadística se empleó un valor de $p < 0,05$ y para la aplicación estadística se utilizó el paquete SPSS® versión 15.0 (IBM, Nueva York, Estados Unidos).

En el estudio biomecánico, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para las variables estudiadas. La carga de rotura media fue 2,29 N (0,71) a la semana, 5,88 N (2,66) a las 2 semanas y 13,97 N (4,87) a las 4 semanas. Al analizar cada grupo en función del tiempo, se observó que la carga de rotura a la semana de tratamiento fue la misma en ambos grupos, 2,29 N ($p=0,827$). A las 2 semanas, la carga de rotura en el grupo de PRP + células fue 7,87 N (2,18) y en el grupo de PRP 3,89 N (0,99), con un valor de $p=0,05$. A las 4 semanas fueron 11,31 N (1,48) y 16,62 N (6) respectivamente, con un valor de $p=0,127$.

Respecto al estudio histológico, en ninguno de los casos, con o sin células, la entesis se regeneró por completo tras la reparación quirúrgica. El tendón fue sustituido por un tejido cicatricial, más desorganizado y celular al principio (72 horas), para aparecer un tejido conjuntivo denso, casi regular, a las 4 semanas pero sin llegar a tener las características histológicas de un tendón nativo. En todos los casos el tendón cicatrizado fracasó a nivel de la sutura en la unión hueso-tendón.

La presencia de vasos fue mayor en todos los tiempos en el grupo con aporte de CMDL. A la semana fue de 2 (0) en el grupo con PRP + células y 1 (0) en el grupo con PRP ($p=0,047$). A las 4 semanas, fue 1(0) y 0(0), respectivamente ($p=0,047$). Las fibras de colágeno aumentaron de forma progresiva con el tiempo, siendo mayores en el grupo con células. Estaban presentes en el 25% del tejido con células a la semana de la intervención y ausentes en las muestras con PRP ($p=0,047$).

Al analizar los resultados mediante tendencias temporales se observó una tendencia a la disminución de vasos e inflamación y aumento de células reparativas y fibras de colágeno con el tiempo en ambos grupos de tratamiento. Sin embargo, estos valores fueron mayores en el grupo con células para los fibroblastos, el colágeno tipo I y tipo III y el cartílago. Con un valor para los fibroblastos de 0,664 ($p=0,001$) en el grupo de células frente a un 0,406 ($p<0,001$) en el grupo de PRP. Para el colágeno tipo I se obtiene un 0,799 ($p<0,001$) en el grupo con aporte celular y 0,503 ($p<0,001$) en el grupo con PRP. Respecto al colágeno tipo III, 0,303 ($p<0,001$) en el grupo con células y 0,097 ($p=0,118$) en el grupo de PRP. En el caso del cartílago, 0,786 ($p<0,001$) en el grupo con células y 0,097 ($p=0,119$) en el grupo de PRP.

Las suturas del manguito rotador fracasan debido a la incapacidad del tejido reparado de cicatrizar adecuadamente. La entesis nativa no se reproduce, en su lugar se forma un tejido cicatricial menos resistente. El uso de terapias biológicas trata de mejorar el entorno biológico en la zona de reparación para restaurar la estructura de la entesis nativa. En nuestro estudio el uso de CMDL y PRP en un modelo de rotura de tendón supraespinoso en ratas mejora la histología de la

entesis. En base a estos resultados, cabría esperar un aumento de la resistencia mecánica del tendón en el grupo con CMDL. Sin embargo, tan sólo observamos una mayor carga de rotura a las 2 semanas que no alcanza la significación estadística($p=0,005$).

Estos resultados apoyarían la teoría de un efecto sinérgico entre las CMDL y el PRP sobre el tendón. Serán necesarios más estudios dedicados a combinar distintas terapias biológicas para aumentar nuestro conocimiento actual sobre su efecto en la cicatrización del manguito rotador.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Yamaguchi K, Ditsios K, Middleton WD, Hildebolt CF, Galatz LM, Teefey SA. The demographic and morphological features of rotator cuff disease. A comparison of asymptomatic and symptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am* 2006 Aug;88(8):1699-1704.
- 2) Morse K, Davis AD, Afra R, Kaye EK, Schepsis A, Voloshin I. Arthroscopic versus mini-open rotator cuff repair: a comprehensive review and meta-analysis. *Am J Sports Med* 2008 Sep;36(9):1824-1828.
- 3) Verma NN, Dunn W, Adler RS, Cordasco FA, Allen A, MacGillivray J, Craig E, Warren RF, Altchek DW. All-arthroscopic versus mini-open rotator cuff repair: a retrospective review with minimum 2-year follow-up. *Arthroscopy* 2006 Jun;22(6):587-594.
- 4) Bishop J, Klepps S, Lo IK, Bird J, Gladstone JN, Flatow E. Cuff integrity after arthroscopic versus open rotator cuff repair: a prospective study. *J Shoulder Elbow Surg* 2006 May-Jun;15(3):290-299.
- 5) Galatz LM, Ball CM, Teefey SA, Middleton WD, Yamaguchi K. The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 2004 Feb;86-A(2):219-224.
- 6) Harryman DT 2nd, Mack LA, Wang KY, Jackins SE, Richardson ML, Matsen FA 3rd. Repairs of the rotator cuff. Correlation of functional results with integrity of the cuff. *J Bone Joint Surg Am* 1991 Aug;73(7):982-989.
- 7) Slabaugh MA, Nho SJ, Grumet RC, Wilson JB, Seroyer ST, Frank RM, Romeo AA, Provencher MT, Verma NN. Does the literature confirm superior clinical results in radiographically healed rotator cuffs after rotator cuff repair?

- Arthroscopy 2010 Mar;26(3):393-403.
- 8) Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, Havlioglu N, Silva MJ, Thomopoulos S. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. J Orthop Res 2006, Mar;24(3):541-550.
 - 9) Mehta S, Gimbel JA, Soslowsky LJ. Etiologic and pathogenetic factors for rotator cuff tendinopathy. Clin Sports Med 2003 Oct;22(4):791-812.
 - 10) Freedman L, Munro RR. Abduction of the arm in the scapular plane: scapular and glenohumeral movements. A roentgenographic study. J Bone Joint Surg Am 1966 Dec;48(8):1503-1510.
 - 11) Clark JM, Harryman DT 2nd. Tendons, ligaments, and capsule of the rotator cuff. Gross and microscopic anatomy. J Bone Joint Surg Am 1992 Jun;74(5):713-725.
 - 12) Matsen FA, Febringer EV, Lippit SB, Wirth MA, Rockwood CA. Rotator cuff. En: Rockwood, Matsen, Wirth, Lippit editores. The Shoulder. 4^a ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2009. p.771-889.
 - 13) DeFranco MJ, Cole BJ. Current perspectives on rotator cuff anatomy. Arthroscopy 2009 Mar;25(3):305-320.
 - 14) Dugas JR, Campbell DA, Warren RF, Robie BH, Millett PJ. Anatomy and dimensions of rotator cuff insertions. J Shoulder Elbow Surg 2002 Sep-Oct;11(5):498-503.
 - 15) Mochizuki T, Sugaya H, Uomizu M, Maeda K, Matsuki K, Sekiya I, Muneta T, Akita K. Humeral insertion of the supraspinatus and infraspinatus. New anatomical findings regarding the footprint of the rotator cuff. Surgical technique. J Bone Joint Surg Am 2009 Mar 1;91 Suppl 2 Pt 1:1-7.

- 16)Curtis AS, Burbank KM, Tierney JJ, Scheller AD, Curran AR. The insertional footprint of the rotator cuff: an anatomic study. *Arthroscopy* 2006 Jun;22(6):603-609.
- 17)Huegel J, Williams AA, Soslowsky LJ. Rotator cuff biology and biomechanics: a review of normal and pathological conditions. *Curr Rheumatol Rep* 2015 Jan;17(1):476.
- 18)Parsons IM, Apreleva M, Fu FH, Woo SL. The effect of rotator cuff tears on reaction forces at the glenohumeral joint. *J Orthop Res* 2002 May;20(3):439-446.
- 19)Itoi E, Berglund LJ, Grabowski JJ, Schultz FM, Growney ES, Morrey BF, An KN. Tensile properties of the supraspinatus tendon. *J Orthop Res* 1995 Jul;13(4):578-584.
- 20)Neer CS 2nd. Impingement lesions. *Clin Orthop Relat Res* 1983 Mar;173:70–77.
- 21)Lehman C, Cuomo F, Kummer FJ, Zuckerman JD. The incidence of full thickness rotator cuff tears in a large cadaveric population. *Bull Hosp Jt Dis* 1995;54(1):30–31.
- 22)Sher JS, Uribe JW, Posada A, Murphy BJ, Zlatkin MB. Abnormal findings on magnetic resonance images of asymptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am.* 1995 Jan;77(1):10–15.
- 23)Tempelhof S, Rupp S, Seil R. Age-related prevalence of rotator cuff tears in asymptomatic shoulders. *J Shoulder Elbow Surg* 1999 Jul-Ago;8(4):296–299.
- 24)Yamamoto A, Takagishi K, Osawa T, Yanagawa T, Nakajima D, Shitara H, Kobayashi T. Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. *J Shoulder Elbow Surg* 2010 Jan;19(1):116–120.
- 25)Neer CS 2nd. Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in

- the shoulder: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 1972 Jan;54(1):41-50.
- 26)Bigliani LU, Morrison DS, April EW. The morphology of the acromion and its relationship to rotator cuff tears. *Orthop Trans* 1986;10:228.
- 27)Ogawa K, Yoshida A, Inokuchi W, Naniwa T. Acromial spur: relationship to aging and morphologic changes in the rotator cuff. *J Shoulder Elbow Surg* 2005 Nov-Dec;14(6):591– 598.
- 28)Nyffeler RW, Werner CML, Sukthankar A, Schmid MR, Gerber C. Association of a large lateral extension of the acromion with rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 2006 Apr; 88(4):800–805.
- 29)Moor BK, Bouaicha S, Rothenfluh DA, Sukthankar A, Gerber C. Is there an association between the individual anatomy of the scapula and the development of rotator cuff tears or osteoarthritis of the glenohumeral joint?: A radiological study of the critical shoulder angle. *Bone Joint J* 2013 Jul;95-B(7):935-941.
- 30)Moor BK, Röthlisberger M, Müller DA, Zumstein MA, Bouaicha S, Ehlinger M, Gerber C. Age, trauma and the critical shoulder angle accurately predict supraspinatus tendon tears. *Orthop Traumatol Surg Res* 2014 Sep;100(5):489-494
- 31)Moseley HF, Goldie I. The arterial pattern of the rotator cuff of the shoulder. *J Bone Joint Surg Br* 1963 Nov;45(4):780-789.
- 32)Lohr JF, Uthoff HK. The microvascular pattern of the supraspinatus tendon. *Clin Orthop Relat Res.* 1990 May;254:35-38.
- 33)Fukuda H, Hamada K, Yamanaka K. Pathology and pathogenesis of bursal-side rotator cuff tears viewed from en bloc histologic sections. *Clin Orthop Relat Res* 1990 May;254:75- 80.

- 34)Tashjian RZ. Epidemiology, natural history, and indications for treatment of rotator cuff tears. Clin Sports Med 2012 Oct;31(4):589-604.
- 35)Carbone S, Gumina S, Arceri V, Campagna V, Fagnani C, Postacchini F. The impact of preoperative smoking habit on rotator cuff tear: cigarette smoking influences rotator cuff tear sizes. J Shoulder Elbow Surg 2012 Jan;21(1):56-60.
- 36)Harvie P, Ostlere SJ, Teh J, McNally EG, Clipsham K, Burston BJ, Pollard TC, Carr AJ. Genetic influences in the aetiology of tears of the rotator cuff. Sibling risk of a full-thickness tear. J Bone Joint Surg Br 2004 Jul;86(5):696–700.
- 37)Jensen KL, Williams GR, Russell IJ, Rockwood CA Jr. Rotator cuff tear arthropathy. J Bone Joint Surg Am. 1999, Sep;81(9):1312-1324.
- 38)Oh JH, Jun BJ, McGarry MH, Lee TQ. Does a critical rotator cuff tear stage exist?: a biomechanical study of rotator cuff tear progression in human cadaver shoulders. J Bone Joint Surg Am 2011 Nov 16;93(22):2100-2109.
- 39)Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. Ann Rheum Dis 1994 Jun;53(6):359-566.
- 40)Habermeyer P, Krieter C, Tang KL, Lichtenberg S, Magosch P. A new arthroscopic classification of articular-sided supraspinatus footprint lesions: a prospective comparison with Snyder's and Ellman's classification. J Shoulder Elbow Surg 2008 Nov–Dec; 17(6):909–913.
- 41)DeOrio JK, Cofield RH. Results of a second attempt at surgical repair of a failed initial rotator-cuff repair. J Bone Joint Surg Am 1984 Apr 66(4):563–567.
- 42)Davidson J, Burkhart SS. The geometric classification of rotator cuff tears: a system linking tear pattern to treatment and prognosis. Arthroscopy 2010

- Mar;26(3):417-424.
- 43)Warner JJ, Higgins L, Parsons IM, Dowdy P. Diagnosis and treatment of anterosuperior rotator cuff tears. J Shoulder Elbow Surg 2001 Jan-Feb; 10(1):37-46.
- 44)Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L,Voisin MC. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre-and postoperative evaluation by CT scan. Clin Orthop Relat Res 1994 Jul;304:78-83.
- 45)Thomazeau H, Rolland Y, Lucas C, Duval JM, Langlais F. Atrophy of the supraspinatus belly. Assessment by MRI in 55 patients with rotator cuff pathology. Acta Orthop Scand 1996 Jun;67(3):264-268.
- 46)Patte D. Classification of rotator cuff lesions. Clin Orthop Relat Res 1990 May;254:81-86.
- 47)Snyder SJ. Arthroscopic classification of rotator cuff lesions and surgical decision making. En: Snyder SJ editores. Shoulder arthroscopy. 2^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2003. p 201-207.
- 48)Kim HM, Dahiya N, Teefey SA, Middleton WD, Stobbs G, Steger-May K, Yamaguchi K, Keener JD. Location and initiation of degenerative rotator cuff tears: an analysis of three hundred and sixty shoulders. J Bone Joint Surg Am 2010 May;92(5):1088-1096.
- 49)Mikolczyk DK, Wei AS, Tonino P, Marra G, Williams DA, Himes RD, Wezeman FH, Callaci JJ. Effect of corticosteroids on the biomechanical strength of rat rotator cuff tendon. J Bone Joint Surg Am 2009 May;91(5):1172-1180.
- 50)Cofield RH, Parvizi J, Hoffmeyer PJ, Lanzer WL, Ilstrup DM, Rowland CM. Surgical repair of chronic rotator cuff tears. A prospective long-term study. J Bone Joint Surg Am 2001 Jan; 83-A(1): 71-77.

- 51)Duralde XA, Greene RT. Mini-open rotator cuff repair via an anterosuperior approach. *J Shoulder Elbow Surg* 2008 Sep-Oct;17(5):715-721.
- 52)Park MC, ElAttrache NS, Tibone JE, Ahmad CS, Jun BJ, Lee TQ. Part I: Footprint contact characteristics for a transosseous-equivalent rotator cuff repair technique compared with a double-row repair technique. *J Shoulder Elbow Surg* 2007 Jul-Aug;16(4):461-468.
- 53)Ahmad CS, Stewart AM, Izquierdo R, Bigliani LU. Tendon-bone interface motion in transosseous suture and suture anchor rotator cuff repair techniques. *Am J Sports Med* 2005 Nov;33(11):1667-1671.
- 54)Conti M, Garofalo R, Delle Rose G, Massazza G, Vinci E, Randelli M, Castagna A. Post-operative rehabilitation after surgical repair of the rotator cuff. *Chir Organi Mov* 2009 Apr;93 Suppl 1:S55-63.
- 55)Keener JD, Galatz LM, Stobbs-Cucchi G, Patton R, Yamaguchi K. Rehabilitation following arthroscopic rotator cuff repair: a prospective randomized trial of immobilization compared with early motion. *J Bone Joint Surg Am* 2014 Jan 1;96(1):11-19.
- 56)Watson EM, Sonnabend DH. Outcome of rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2002 May-Jun;11(3):201-211.
- 57)Iannotti JP. Full-Thickness rotator cuff tears: Factors affecting surgical outcome. *J Am Acad Orthop Surg* 1994 Mar;2(2):87-95.
- 58)Gartsman GM, Khan M, Hammerman SM. Arthroscopic repair of full-thickness tears of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Am* 1998 Jun;80(6):832-840.
- 59)Liem D, Bartl C, Lichtenberg S, Magosch P, Habermeyer P. Clinical outcome and tendon integrity of arthroscopic versus mini-open supraspinatus tendon repair: a magnetic resonance imaging-controlled matched-pair analysis.

- Arthroscopy 2007 May;23(5):514-521.
- 60) Nho SJ, Shindle MK, Sherman SL, Freedman KB, Lyman S, MacGillivray JD. Systematic review of arthroscopic rotator cuff repair and mini-open rotator cuff repair. *J Bone Joint Surg Am* 2007 Oct;89 Suppl 3:127-136.
- 61) Lindley K, Jones GL. Outcomes of arthroscopic versus open rotator cuff repair: a systematic review of the literature. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2010 Dec;39(12): 592-600.
- 62) Ji X, Bi C, Wang F, Wang Q. Arthroscopic versus mini-open rotator cuff repair: an up-to-date meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthroscopy* 2015 Jan;31(1):118-124.
- 63) Anderson K, Boothby M, Aschenbrener D, van Holsbeeck M. Outcome and structural integrity after arthroscopic rotator cuff repair using 2 rows of fixation: minimum 2-year follow-up. *Am J Sports Med* 2006 Dec;34(12):1899-1905.
- 64) Boileau P, Brassart N, Watkinson DJ, Carles M, Hatzidakis AM, Krishnan SG. Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: does the tendon really heal? *J Bone Joint Surg Am* 2005 Jun;87(6):1229-1240.
- 65) Carbonel I, Martinez A, Aldea E, Ripalda J, Herrera A. Outcome and structural integrity of rotator cuff after arthroscopic treatment of large and massive tears with double row technique: a 2-year followup. *Adv Orthop* 2013;2013:914148.
- 66) Castagna A, Conti M, Markopoulos N, Borroni M, De Flaviis L, Giardella A, Garofalo R. Arthroscopic repair of rotator cuff tear with a modified Mason-Allen stitch: mid-term clinical and ultrasound outcomes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008 May;16(5):497-503.
- 67) Charousset C, Bellaïche L, Kalra K y cols. Arthroscopic repair of full-thickness

- rotator cuff tears: is there tendon healing in patients aged 65 years or older? *Arthroscopy* 2010 Mar;26(3):302-309.
- 68)Cho NS, Rhee YG. The factors affecting the clinical outcome and integrity of arthroscopically repaired rotator cuff tears of the shoulder. *Clin Orthop Surg* 2009 Jun;1(2):96-104. Epub 2009 May 30.
- 69)Choi CH, Kim SK, Cho MR, Baek SH, Lee JK, Kim SS, Park CM. Functional outcomes and structural integrity after double-pulley suture bridge rotator cuff repair using serial ultrasonographic examination. *J Shoulder Elbow Surg* 2012;21:1753-1763.
- 70)Choi S, Kim MK, Kim GM, Roh YH, Hwang IK, Kang H. Factors associated with clinical and structural outcomes after arthroscopic rotator cuff repair with a suture bridge technique in medium, large, and massive tears. *J Shoulder Elbow Surg* 2014 Nov;23(11):1675-1681.
- 71)Gartsman GM, Drake G, Edwards TB, Elkousy HA, Hammerman SM, O'Connor DP, Press CM. Ultrasound evaluation of arthroscopic full-thickness supraspinatus rotator cuff repair: single-row versus double-row suture bridge (transosseous equivalent) fixation. Results of a prospective, randomized study. *J Shoulder Elbow Surg* 2013 Nov;22(11):1480-1487.
- 72)Hayashida K, Tanaka M, Koizumi K, Kakiuchi M. Characteristic retear patterns assessed by magnetic resonance imaging after arthroscopic double-row rotator cuff repair. *Arthroscopy*. 2012 Apr;28(4):458-464.
- 73)Ide J, Karasugi T, Okamoto N, Taniwaki T, Oka K, Mizuta H. Functional and structural comparisons of the arthroscopic knotless double-row suture bridge and single-row repair for anterosuperior rotator cuff tears. *J Shoulder Elbow Surg* 2015 Oct;24(10):1544-1554.

- 74) Kim JR, Cho YS, Ryu KJ, Kim JH. Clinical and radiographic outcomes after arthroscopic repair of massive rotator cuff tears using a suture bridge technique: assessment of repair integrity on magnetic resonance imaging. *Am J Sports Med* 2012 Apr;40(4):786-793.
- 75) Iannotti JP, Deutsch A, Green A, Rudicel S, Christensen J, Marraffino S, Rodeo S. Time to failure after rotator cuff repair: a prospective imaging study. *J Bone Joint Surg Am* 2013 Jun;95(11):965-971.
- 76) Lapner PL, Sabri E, Rakhra K, McRae S, Leiter J, Bell K, Macdonald P. A multicenter randomized controlled trial comparing single-row with double-row fixation in arthroscopic rotator cuff repair. *J Bone Joint Surg Am* 2012 Jul 18;94(14):1249-1257.
- 77) Mihata T, Watanabe C, Fukunishi K, Ohue M, Tsujimura T, Fujiwara K, Kinoshita M. Functional and structural outcomes of single-row versus double-row versus combined double-row and suture-bridge repair for rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2011 Oct;39(10):2091-2098.
- 78) Neyton L, Godenèche A, Nové-Josserand L, Carrillon Y, Cléchet J, Hardy MB. Arthroscopic suture-bridge repair for small to medium size supraspinatus tear: healing rate and retear pattern. *Arthroscopy* 2013 Jan;29(1):10-17.
- 79) Oh JH, Kim SH, Shin SH, Chung SW, Kim JY, Kim SH, Kim SJ. Outcome of rotator cuff repair in large-to-massive tear with pseudoparalysis: a comparative study with propensity score matching. *Am J Sports Med* 2011 Jul;39(7):1413-1420.
- 80) Toussaint B, Schnaser E, Bosley J, Lefebvre Y, Gobezie R. Early structural and functional outcomes for arthroscopic double-row transosseous-equivalent rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 2011;39(6):1217-1225.

- 81) Voigt C, Bosse C, Vosschenrich R, Schulz AP, Lill H. Arthroscopic supraspinatus tendon repair with suture-bridging technique: functional outcome and magnetic resonance imaging. *Am J Sports Med* 2010 May;38(5):983-991.
- 82) Paxton ES, Teefey SA, Dahiya N, Keener JD, Yamaguchi K, Galatz LM. Clinical and radiographic outcomes of failed repairs of large or massive rotator cuff tears: minimum ten-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 2013 Apr 3;95(7): 627-632.
- 83) Yoo JC, Ahn JH, Koh KH, Lim KS. Rotator cuff integrity after arthroscopic repair for large tears with less-than-optimal footprint coverage. *Arthroscopy* 2009 Oct;25(10):1093-1100.
- 84) Nho SJ, Shindle MK, Adler RS, Warren RF, Altchek DW, MacGillivray JD. Prospective analysis of arthroscopic rotator cuff repair: subgroup analysis. *J Shoulder Elbow Surg* 2009 Sep-Oct;18(5):697-704.
- 85) Bjornsson HC, Norlin R, Johansson K, Adolfsson LE. The influence of age, delay of repair, and tendon involvement in acute rotator cuff tears: structural and clinical outcomes after repair of 42 shoulders. *Acta Orthop* 2011 Apr;82(2):187-192.
- 86) Ma CB, Comerford L, Wilson J, Puttlitz CM. Biomechanical evaluation of arthroscopic rotator cuff repairs: double-row compared with single-row fixation. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(2):403-410.
- 87) DeHaan AM, Axelrad TW, Kaye E, Silvestri L, Puskas B, Foster TE. Does double-row rotator cuff repair improve functional outcome of patients compared with single-row technique? A systematic review. *Am J Sports Med* 2012 May;40(5):1176-1185.
- 88) Milano G, Grasso A, Salvatore M, Saccomanno MF, Deriu L, Fabbriani C. Arthroscopic rotator cuff repair with metal and biodegradable suture anchors:

- A prospective randomized study. *Arthroscopy* 2010 Sep;26(9 Suppl):S112-119.
- 89) Barber FA, Herbert MA, Schroeder FA, Aziz-Jacobo J, Mays MM, Rapley JH. Biomechanical advantages of triple-loaded suture anchors compared with double-row rotator cuff repairs. *Arthroscopy* 2010 Mar;26(3):316-323.
- 90) Kannus P, Jozsa L, Jarvinnen M. Basic science of tendons. En: Garrett WE Jr, Speer KP, Kirkendall DT, editores. *Principles and practice of orthopaedic sports medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p 21-37.
- 91) O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997 Apr;7(2):55-61.
- 92) Sharma P1, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 2005 Jan;87(1):187-202.
- 93) Kastelic J, Galeski A, Baer E. The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* 1978;6(1):11-23.
- 94) Evans JH, Barbenel JC. Structural and mechanical properties of tendon related to function. *Equine Vet J* 1975 Jan;7:1-8.
- 95) Von der Mark K. Localization of collagen types in tissues. *Int Rev Connect Tissue Res*.1981;9:265-324.
- 96) Fan L, Sarkar K, Franks DJ, Uthoff HK. Estimation of total collagen and types I and III collagen in canine rotator cuff tendons. *Calcif Tissue Int*. 1997;61(3):223-229.
- 97) Lapiere CM, Nussgens B, Pierard GE. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res* 1977;5(1):21-29.
- 98) Kumagdi J, Sarkar K, Uthoff HK, Okawara Y, Ooshima A. Immunohistochemical distribution of type I, II, and III collagens in the rabbit supraspinatus tendon

- insertion. *J Anat* 1994 Oct;185:279-284.
- 99)Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 1998;16(8):457-470.
- 100)Fukuta S, Oyama M, Kvalkovich K, Fu FH, Niyibizi C. Identification of types 11, IX and X collagens at the insertion site of the bovine Achilles tendon. *Matrix Biol* 1998;17(1):65-73.
- 101)Moffat KL, Sun WH, Pena PE, Chahine NO, Doty SB, Ateshian GA, Hung CT, Lu HH. Characterization of the structure-function relationship at the ligament-to-bone interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Jun 10;105:7947-7952.
- 102)Thomopoulos S, Williams GR, Gimbel JA, Favata M, Soslowsky LJ. Variation of biomechanical, structural, and compositional properties along the tendon to bone insertion site. *J Orthop Res* 2003 May;21(3):413-419.
- 103)Vogel KG, Sandy JD, Pogány G, Robbins JR. Aggrecan in bovine tendon. *Matrix Biol* 1994 Mar;14(2):171-179.
- 104)Woo SL, Maynard J, Butler DL. Ligament, tendon, and joint capsule insertions to bone. En Woo SL editores. *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*. Savannah GA: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1987. p 126-166.
- 105)Guede D, González P, Caeiro JR. Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2013 Mar;5(1):43-50.
- 106)Carpenter JE, Thomopoulos S, Flanagan CL, DeBano CM, Soslowsky LJ. Rotator cuff defect healing: A biomechanical and histologic analysis in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 1998 Nov-Dec;7(6):599-605.

- 107)Gulotta LV, Rodeo SA. Growth factors for rotator cuff repair. Clin Sports Med. 2009 Jan;28(1):13-23.
- 108)Tillman LJ, Chasan NP. Properties of dense connective tissue and wound healing. En: Hertling D, Kessler RM, editores. Management of common musculo-skeletal disorders: physical therapy principles and methods. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott; 1996. p 8-21.
- 109)Hooley CJ, McCrum NG, Cohen RE. The viscoelastic deformation of tendón. J Biomech 1980;13(6):521-528.
- 110)Abrahamsson SO. Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg Suppl 1991;23:1-51.
- 111)Amiel D, Akeson W, Harwood FL, Frank CB. Stress deprivation effect on metabolic turnover of medial collateral ligament collagen. A comparison between nine- and 12-week immobilization. Clin Orthop Relat Res 1983 Jan-Feb;(172):265-270.
- 112)Thomopoulos S, Genin GM, Galatz LM. The development and morphogenesis of the tendon-to-bone insertion - what development can teach us about healing -. J Musculoskelet Neuronal Interact 2010 Mar;10(1):35-45.
- 113)Komi PV, Salonen M, Jarvinen M, Kokko O. In vivo registration of Achilles tendon forces in man. I. Methodological development. Int J Sports Med 1987 Mar; 8 Suppl 1:3-8.
- 114)Thomopoulos S, Harwood FL, Silva MJ, Amiel D, Gelberman RH. Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro. J Hand Surg Am 2005 May;30(3):441-447.
- 115)Ichinose R, Sano H, Kishimoto KN, Sakamoto N, Sato M, Itoi E. Alteration of the

- material properties of the normal supraspinatus tendon by nicotine treatment in a rat model. *Acta Orthop* 2010 Oct;81(5):634-638.
- 116)Peltz CD, Dourte LM, Kuntz AF, Sarver JJ, Kim SY, Williams GR, Soslowsky LJ. The effect of postoperative passive motion on rotator cuff healing in a rat model. *J Bone Joint Surg Am* 2009, Oct;91(10):2421-2429.
- 117)Wurgler-Hauri CC, Dourte LM, Baradet TC, Williams GR, Soslowsky LJ. Temporal expression of 8 growth factors in tendon-to-bone healing in a rat supraspinatus model. *J Shoulder Elbow Surg* 2007 Sep-Oct;16(Suppl 5):S198-203.
- 118)Rodeo SA, Potter HG, Kawamura S, Turner AS, Kim HJ, Atkinson BL. Biologic augmentation of rotator cuff tendon-healing with use of a mixture of osteoinductive growth factors. *J Bone Joint Surg Am* 2007, Nov;89(11):2485-2497
- 119)Kovacevic D, Fox AJ, Bedi A, Ying L, Deng XH, Warren RF, Rodeo SA. Calcium-phosphate matrix with or without TGF- β 3 improves tendon-bone healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 2011, Apr;39(4):811-819.
- 120)Chung SW, Song BW, Kim YH, Park KU, Oh JH. Effect of platelet-rich plasma and porcine dermal collagen graft augmentation for rotator cuff healing in a rabbit model. *Am J Sports Med* 2013, Dec;41(12):2909-2918.
- 121)Oliva F, Via AG, Maffulli N. Role of growth factors in rotator cuff healing. *Sports Med Arthrosc* 2011 Sep;19(3):218-226.
- 122)Uggen C, Dines J, McGarry M, Grande D, Lee T, Limpisvasti O. The effect of recombinant human platelet-derived growth factor BB-coated sutures on rotator cuff healing in a sheep model. *Arthroscopy* 2010 Nov;26(11):1456-1462.

- 123)Uggen JC, Dines J, Uggen CW, Mason JS, Razzano P, Dines D, Grande DA. Tendon gene therapy modulates the local repair environment in the shoulder. *J Am Osteopath Assoc* 2005 Jan;105(1):20-1.
- 124)Pryce BA, Watson SS, Murchison ND, Staverosky JA, Dünker N, Schweitzer R. Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFbeta signaling are essential for tendon formation. *Development* 2009 Apr;136(8):1351-1361.
- 125)Soo C, Beanes SR, Hu FY, Zhang X, Dang C, Chang G, Nishimura I, Freymiller E, Longaker MT, Lorenz HP, Ting K. Ontogenetic transition in fetal wound transforming growth factor-beta regulation correlates with collagen organization. *Am J Pathol* 2003 Dec;163(6):2459-2476.
- 126)Aspenberg P, Forslund C. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. *Acta Orthop Scand* 1999 Feb;70(1):51-54.
- 127)Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003 Aug;85-A(8):1544-1552.
- 128)Seeherman HJ, Archambault JM, Rodeo SA, Turner AS, Zekas L, D'Augusta D, Li XJ, Smith E, Wozney JM. RhBMP-12 accelerates healing of rotator cuff repairs in a sheep model. *J Bone Joint Surg Am* 2008, Oct;90(10):2206-2219.
- 129)Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Ehteshami JR, Rodeo SA. Adenoviral-mediated gene transfer of human bone morphogenetic protein-13 does not improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med* 2011, Jan;39(1):180-187.
- 130)Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K, Sakamoto H, Fujimoto T, Mizuta H. The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone

- remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. *J Shoulder Elbow Surg* 2009 May-Jun;18(3):391-398.
- 131) Kobayashi M, Itoi E, Minagawa H, Miyakoshi N, Takahashi S, Tuoheti Y, Okada K, Shimada Y. Expression of growth factors in the early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits. *J Shoulder Elbow Surg* 2006 May-Jun;15(3):371-377.
- 132) Zhang F, Liu H, Stile F, Lei MP, Pang Y, Oswald TM, Beck J, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. Effect of vascular endothelial growth factor on rat achilles tendon healing. *Plast Reconstr Surg* 2003 Nov;112(6):1613-1619.
- 133) Tang JB, Cao Y, Zhu B, Xin KQ, Wang XT, Liu PY. Adeno-associated virus-2-mediated bFGF gene transfer to digital flexor tendons significantly increases healing strength. An in vivo study. *J Bone Joint Surg Am* 2008 May;90(5):1078-1089.
- 134) Garofalo R, Cesari E, Vinci E, Castagna A. Role of metalloproteinases in rotator cuff tear. *Sports Med Arthrosc* 2011, Sep;19(3):207-212.
- 135) Del Buono A, Oliva F, Longo UG, Rodeo SA, Orchard J, Denaro V, Maffulli N. Metalloproteases and rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Feb;21(2):200-208.
- 136) Castagna A, Cesari E, Garofalo R, Gigante A, Conti M, Markopoulos N, Maffulli N. Matrix metalloproteases and their inhibitors are altered in torn rotator cuff tendons, but also in the macroscopically and histologically intact portion of those tendons. *Muscles Ligaments Tendons J* 2013 Aug;3(3):132-138.
- 137) Lo IK, Marchuk LL, Hollinshead R, Hart DA, Frank CB. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons. *Am J Sports Med* 2004 Jul-Aug;32(5):1223-1229.

- 138) Bedi A, Fox AJ, Kovacevic D, Deng XH, Warren RF, Rodeo SA. Doxycycline-mediated inhibition of matrix metalloproteinases improves healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 2010, Feb;38(2):308-317.
- 139) Isaac C, Gharaibeh B, Witt M, Wright VJ, Huard J. Biologic approaches to enhance rotator cuff healing after injury. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Feb;21(2):181-190.
- 140) Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K, Sakamoto H, Mizuta H. Reconstruction of large rotator-cuff tears with acellular dermal matrix grafts in rats. *J Shoulder Elbow Surg* 2009 Mar-Apr;18(2):288-295.
- 141) Zalavras CG, Gardocki R, Huang E, Stevanovic M, Hedman T, Tibone J. Reconstruction of large rotator cuff tendon defects with porcine small intestinal submucosa in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 2006 Mar-Apr;15(2):224-231.
- 142) Xu H, Sandor M, Qi S, Lombardi J, Connor J, McQuillan DJ, Iannotti JP. Implantation of a porcine acellular dermal graft in a primate model of rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, May;21(5):580-588.
- 143) Ricchetti ET, Aurora A, Iannotti JP, Derwin KA. Scaffold devices for rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Feb;21(2):251-265.
- 144) Bond JL, Dopirak RM, Higgins J, Burns J, Snyder SJ. Arthroscopic replacement of massive, irreparable rotator cuff tears using a graftjacket allograft: Technique and preliminary results. *Arthroscopy* 2008, Apr;24(4):403-409
- 145) Iannotti JP, Codsi MJ, Kwon YW, Derwin K, Ciccone J, Brems JJ. Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 2006, Jun;88(6):1238-1244.

- 146)Iwata Y, Morihara T, Tachiiri H, Kajikawa Y, Yoshida A, Arai Y, Tokunaga D, Sakamoto H, Matsuda K, Kurokawa M, Kawata M, Kubo T. Behavior of host and graft cells in the early remodeling process of rotator cuff defects in a transgenic animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 2008 Jan-Feb;17(1 Suppl):101S-107S.
- 147)Moore DR, Cain EL, Schwartz ML, Clancy WG Jr. Allograft reconstruction for massive, irreparable rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2006, Mar;34(3):392-396.
- 148)Cho NS, Yi JW, Rhee YG. Arthroscopic biceps augmentation for avoiding undue tension in repair of massive rotator cuff tears. *Arthroscopy* 2009, Feb;25(2):183-191.
- 149)Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004 Nov;114(6):1502-1508.
- 150)Maynard DM, Heijnen HF, Gahl WA, Gunay-Aygun M. The alpha-granule proteome: Novel proteins in normal and ghost granules in gray platelet syndrome. *J Thromb Haemost* 201 Aug;8(8):1786-1796.
- 151)DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 2012 Jul;28(7):998-1009.
- 152)Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007 Feb;35(2):245-251.
- 153)Graziani, F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin. Oral Implants Res* 2006 Apr;17(2):212-219.
- 154)Hee HT, Majd ME, Holt RT, Myers L. Do autologous growth factors enhance

- transforaminal lumbar interbody fusion? *Eur Spine J* 2003 Aug;12(4):400-407.
- 155) Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004 Apr;34(4):665-671.
- 156) Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009 Mar;27(3):158-167.
- 157) Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, Rasmusson L, Evert PA. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 2012 Jun;13(7):1131-1137.
- 158) Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie. Le PRF (Platelet-Rich Fibrin). *Implantodontie* 2001;41:55-62.
- 159) Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Kevy S, Murray MM. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Apr;66(4):684-690.
- 160) Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med* 2008 Mar;42(5):314-320.
- 161) Kim ES, Kim JJ, Park EJ. Angiogenic factor-enriched platelet-rich plasma enhances in vivo bone formation around alloplastic graft material. *J Adv Prosthodont* 2010 Mar;2(1):7-13.
- 162) Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, Sanchez M, Johnson DH. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy* 2010 Feb;26(2):269-278.

- 163) Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Dec 23;(12):CD010071.
- 164) Raeissadat SA, Sedighipour L, Rayegani SM, Bahrami MH, Bayat M, Rahimi R. Effect of platelet-rich plasma (PRP) versus autologous whole blood on pain and function improvement in tennis elbow: A randomized clinical trial. *Pain Res Treat* 2014;2014:191525.
- 165) Ahmad Z, Brooks R, Kang SN, Weaver H, Nunney I, Tytherleigh-Strong G, Rushton N. The effect of platelet-rich plasma on clinical outcomes in lateral epicondylitis. *Arthroscopy* 2013 Nov;29(11):1851-1862.
- 166) Sheth U, Simunovic N, Klein G, Fu F, Einhorn TA, Schemitsch E, Ayeni OR, Bhandari M. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2012 Feb 15;94(4):298-307.
- 167) Hoppe S, Alini M, Benneker LM, Milz S, Boileau P, Zumstein MA. Tenocytes of chronic rotator cuff tendon tears can be stimulated by platelet-released growth factors. *J Shoulder Elbow Surg* 2013 Mar;22(3):340-349.
- 168) Jo CH, Kim JE, Yoon KS, Shin S. Platelet-rich plasma stimulates cell proliferation and enhances matrix gene expression and synthesis in tenocytes from human rotator cuff tendons with degenerative tears. *Am J Sports Med* 2012 May;40(5):1035-1045.
- 169) Antuña S, Barco R, Martínez Díez JM, Sánchez Márquez JM. Platelet-rich fibrin in arthroscopic repair of massive rotator cuff tears: a prospective randomized pilot clinical trial. *Acta Orthop Belg* 2013 Feb;79(1):25-30.
- 170) Ruiz-Moneo P, Molano-Muñoz J, Prieto E, Algorta J. Plasma rich in growth factors in arthroscopic rotator cuff repair: A randomized, double-blind,

- controlled clinical trial. *Arthroscopy* 2013, Jan;29(1):2-9.
- 171) Sánchez M, Anitua E, Andia I. Poor standardization in platelet-rich therapies hampers advancement. *Arthroscopy* 2010;26(6):725-726.
- 172) Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: A prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg* 2011 Jun;20(4):518-528.
- 173) Gumina S, Campagna V, Ferrazza G, Giannicola G, Fratalocchi F, Milani A, Postacchini F. Use of platelet-leukocyte membrane in arthroscopic repair of large rotator cuff tears: A prospective randomized study. *J Bone Joint Surg Am* 2012, Aug 1;94(15):1345-1352.
- 174) Rodeo SA, Delos D, Williams RJ, Adler RS, Pearle A, Warren RF: The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff tendon healing: A prospective, randomized clinical study. *Am J Sports Med* 2012 Jun;40(6):1234-1241
- 175) Zhao JG, Zhao L, Jiang YX, Wang ZL, Wang J, Zhang P. Platelet-rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthroscopy* 2015 Jan;31(1):125-135.
- 176) Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007 May 11;100(9):1249-1260.
- 177) García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, Castro JG, Arranz MG, Vicente A, Bueren J, García-Olmo D. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* 2010, Oct;10(10):1453-1468.
- 178) Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002 Nov;12(11):502-508.
- 179) Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage,

- plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev* 2005;1(2):169-178.
- 180)Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2;284(5411):143-147.
- 181)Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000 Aug;164(2):247-256.
- 182)Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002 Apr 4;416(6880):542-545.
- 183)Watt FM, Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches. *Science* 2000 Feb 25;287(5457):1427-1430.
- 184)Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell Tissue Res* 2008, Jun;332(3):469-478.
- 185)Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem.* 1964 Feb;239:375-380.
- 186)Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell W, Katz AJ,Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001 Apr;7(2):211–228.
- 187)García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, Montes JA, Pinto FL, Marcos DH, García-Sancho L. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal crohn's disease: A new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 2003, Sep;18(5):451-454.

- 188) Gimble JM, Bunnell BA, Guilak F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen Med* 2012 Mar;7(2):225-235.
- 189) Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013 Jun;15(6):641-648.
- 190) Schäffler A, Büchler C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007 Apr;25(4):818-827.
- 191) Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007 Nov;213(2):341-347.
- 192) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002 Dec;13(12):4279-4295.
- 193) Gimble JM, Grayson W, Guilak F, Lopez MJ, Vunjak-Novakovic G. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci* 2011 Jan 1;3:69-81.
- 194) Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, Watanabe A, Migita M, Shimada T. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nihon Med Sch* 2004 Aug;71(4):240-241.
- 195) Bacou F, el Andalousi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, Casteilla L, Reyne Y, Noguès J. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal

- muscle. *Cell Transplant* 2004;13(2):103-111.
- 196) Jack GS, Almeida FG, Zhang R, Alfonso ZC, Zuk PA, Rodríguez LV. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol* 2005 Nov;174(5):2041-2045.
- 197) Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003 Jul;126(1):124-232.
- 198) Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003;Aug;3(5):705-713.
- 199) Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Apr 29;330(1):142-150.
- 200) Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Mar 4;328(1):258-264.
- 201) Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Mar 24;341(4):1135-1140.
- 202) Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG, Kim CH. Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev* 2006 Aug;15(4):583-594.
- 203) Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size

- mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004 May;22(5):560-567.
- 204) Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. *J Nihon Med Sch* 2009 Apr;76(2):56-66.
- 205) Schenke-Layland K, Strem BM, Jordan MC, Deemedio MT, Hedrick MH, Roos KP, Fraser JK, Maclellan WR. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction. *J Surg Res* 2009 May 15;153(2):217-223.
- 206) Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B, Prosper F. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res* 2011 Apr;4(2):145-153.
- 207) Mendel TA, Clabough EB, Kao DS, Demidova-Rice TN, Durham JT, Zotter BC, Seaman SA, Cronk SM, Rakoczy EP, Katz AJ, Herman IM, Peirce SM, Yates PA. Pericytes derived from adipose-derived stem cells protect against retinal vasculopathy. *PLoS One* 2013 May 31;8(5):e65691.
- 208) Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. Stem cells treatment for sciatic nerve injury. *Expert Opin Biol Ther* 2011 Dec;11(12):1591-1597.
- 209) De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: Advances and applications. *Curr Mol Med* 2012 Jun;12(5):574-591.
- 210) Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006 Nov;24(11):2582-2591.
- 211) Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 2008

- Jun;14(6):945- 953.
- 212) Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: A healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007 Apr 15;119(5):1409-22.
- 213) Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther* 2008 Sep;8(9):1417-1423.
- 214) Payo Rodríguez J. Uso de células madre derivadas de la grasa en las roturas agudas del tendón de Aquiles. Estudio experimental en ratas. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Madrid. 2010.
- 215) Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, Dagher E, Packer JD, Rodeo SA. Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am J Sports Med* 2009 Nov;37(11):2126-2133.
- 216) Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Deng XH, Rodeo SA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med* 2011 Jun;39(6):1282-1289.
- 217) Oh JH, Chung SW, Kim SH, Chung JY, Kim JY. 2013 Neer Award: Effect of the adipose-derived stem cell for the improvement of fatty degeneration and rotator cuff healing in rabbit model. *J Shoulder Elbow Surg* 2014 Apr;23(4):445-455 .
- 218) Valencia Mora M, Antuña Antuña S, García Arranz M, Carrascal MT, Barco R. Application of adipose tissue-derived stem cells in a rat rotator cuff repair model. *Injury* 2014 Oct;45 Suppl 4:S22-7.
- 219) Barco R, Encinas C, Valencia M, Carrascal MT, Garcia-Arranz M, Antuña S. Use

- of adipose-derived stem cells in an experimental rotator cuff fracture model. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2015 Jan-Feb;59(1):3-8.
- 220) Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Durant TJ, Chowanec DM, Solovyova O, Russell RP, Arciero RA, Mazzocca AD. Comparison of mesenchymal stem cells (osteoprogenitors) harvested from proximal humerus and distal femur during arthroscopic surgery. *Arthroscopy* 2013 Feb;29(2):301-308.
- 221) Randelli P, Conforti E, Piccoli M, Ragone V, Creo P, Cirillo F, Masuzzo P, Tringali C, Cabitza P, Tettamanti G, Gagliano N, Anastasia L. Isolation and characterization of 2 new human rotator cuff and long head of biceps tendon cells possessing stem cell-like self-renewal and multipotential differentiation capacity. *Am J Sports Med* 2013 Jul;41(7):1653-1664.
- 222) Utsunomiya H, Uchida S, Sekiya I, Sakai A, Moridera K, Nakamura T. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from shoulder tissues involved in rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2013 Mar; 41(3):657-668.
- 223) Ellera Gomes JL, da Silva RC, Silla LM, Abreu MR, Pellanda R. Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012 Feb;20:373-377.
- 224) Hernigou P, Flouzat Lachaniette CH, Delambre J, Zilber S, Duffiet P, Chevallier N, Rouard H. Biologic augmentation of rotator cuff repair with mesenchymal stem cells during arthroscopy improves healing and prevents further tears: a case-controlled study. *Int Orthop* 2014 Sep;38(9):1811-1818.
- 225) Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, Gimble JM, Devireddy RV. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of

- adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog* 2005 Sep-Oct;21(5):1511-1524.
- 226)Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 2005 May 2;201(9):1397-1405.
- 227)Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317.
- 228)Anitua E. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004 Jan;91(1): 4-15.
- 229)Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Practical Procedures & Aesthetic Dentistry* 2001 Aug;13(6):487-493.
- 230)Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006 May;24(5):227-234.
- 231)Iannotti JP, Deutsch A, Green A, Rudicel S, Christensen J, Marraffino S, Rodeo S. Time to failure after rotator cuff repair: a prospective imaging study. *J Bone Joint Surg Am* 2013 Jun 5;95(11):965-971.
- 232)Cummins CA, Murrell GA. Mode of failure for rotator cuff repair with suture anchors identified at revision surgery. *J Shoulder Elbow Surg* 2003 Mar-Apr;12(2):128-133.

- 233)Thomopoulos S, Soslowsky LJ, Flanagan CL, Tun S, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE. The effect of fibrin clot on healing rat supraspinatus tendon defects. *J Shoulder Elbow Surg* 2002 May-Jun;11(3):239-247.
- 234)Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 1996 Sep-Oct;5(5):383-392.
- 235)Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE. Neer award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: A histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg* 2000 Mar-Apr;9(2):79-84.
- 236)Matsumoto F, Uthoff HK, Trudel G, Loehr JF. Delayed tendon reattachment does not reverse atrophy and fat accumulation of the supraspinatus-an experimental study in rabbits. *J Orthop Res*. 2002 Mar;20(2):357-363.
- 237)Chang CH, Chen CH, Su CY, Liu HT, Yu CM. Rotator cuff repair with periosteum for enhancing tendon-bone healing: a biomechanical and histological study in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009 Dec;17(12):1447-1453.
- 238)Fealy S, Rodeo SA, MacGillivray JD, Nixon AJ, Adler RS, Warren RF. Biomechanical evaluation of the relation between number of suture anchors and strength of the bone-tendon interface in a goat rotator cuff model. *Arthroscopy* 2006 Jun;22(6):595-602.
- 239)MacGillivray JD, Fealy S, Terry MA, Koh JL, Nixon AJ, Warren RF. Biomechanical evaluation of a rotator cuff defect model augmented with a bioresorbable scaffold in goats. *J Shoulder Elbow Surg* 2006 Sep-Oct;15(5):639-644.

- 240) Coleman SH, Fealy S, Ehteshami JR, MacGillivray JD, Altchek DW, Warren RF, Turner AS. Chronic rotator cuff injury and repair model in sheep. *J Bone Joint Surg Am* 2003 Dec;85-A(12):2391-2402.
- 241) Gerber C, Meyer DC, Schneeberger AG, Hoppeler H, von Rechenberg B. Effect of tendon release and delayed repair on the structure of the muscles of the rotator cuff: an experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Am* 2004 Sep;86-A(9):1973-1982.
- 242) Aoki M, Oguma H, Fukushima S, Ishii S, Ohtani S, Murakami G. Fibrous connection to bone after immediate repair of the canine infraspinatus: the most effective bony surface for tendon attachment. *J Shoulder Elbow Surg* 2001 Mar-Apr;10(2):123-128.
- 243) Adams JE, Zobitz ME, Reach JS Jr, An KN, Steinmann SP. Rotator cuff repair using an acellular dermal matrix graft: an in vivo study in a canine model. *Arthroscopy* 2006 Jul;22(7):700-709.
- 244) Nho SJ, Delos D, Yadav H, Pensak M, Romeo AA, Warren RF, MacGillivray JD. Biomechanical and biologic augmentation for the treatment of massive rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2010 Mar;38(3):619-629.
- 245) Roach HI, Mehta G, Oreffo RO, Clarke NM, Cooper C. Temporal analysis of rat growth plates: Cessation of growth with age despite presence of a physis. *J Histochem Cytochem* 2003 Mar;51(3):373-383.
- 246) Buchmann S, Walz L, Sandmann GH, Hoppe H, Beitzel K, Wexel G, Battmann A, Vogt S, Hinterwimmer S, Imhoff AB. Rotator cuff changes in a full thickness tear rat model: Verification of the optimal time interval until reconstruction for comparison to the healing process of chronic lesions in humans. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011 Mar;131(3):429-435.

- 247)Rodeo SA. Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair. J Shoulder Elbow Surg 2007 Sep-Oct;16(5 Suppl):S191-197.
- 248) Kim H, Galatz L, Lim C, Havlioglu N, Thomopoulos S. The effect of tear size and nerve injury on rotator cuff muscle fatty degeneration in a rodent animal model. J Shoulder Elbow Surg 2012;21(7):847-858.
- 249)Liu X, Manzano G, Kim H, Feeley B. A rat model of massive rotator cuff tears. J Orthop Res 2011;29(4):588-595
- 250)Lim JK, Hui J, Li L, Thambyah A, Goh J, Lee EH. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy 2004, Nov;20(9):899-910.
- 251)Peçanha R, Bagno LL, Ribeiro MB, Robottom Ferreira AB, Moraes MO, Zapata-Sudo G, Kasai-Brunswick TH, Campos-de-Carvalho AC, Goldenberg RC, Saar Werneck-de-Castro JP. Adipose-derived stem-cell treatment of skeletal muscle injury. J Bone Joint Surg Am 2012 Apr 4;94(7):609-617.
- 252)Castillo, TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. Am J Sports Med 2011 Feb;39(2):266–271.
- 253)Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Marcacci M. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single-versus double-spinning approach. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2012 Oct;20(10):2082–2091.
- 254)McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. J. Bone Joint Surg Am 2012 Oct 3;94(19):e143(1–8).

- 255) Pizza FX, McLoughlin TJ, McGregor SJ, Calomeni EP, Gunning WT. Neutrophils injure cultured skeletal myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Jul;281(1):C335-C341.
- 256) Schneider BS, Tiidus PM. Neutrophil infiltration in exercise injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med* 2007;37:837-856.
- 257) Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed HO, Sundman EA, Minas T, Fortier LA. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med*. 2014 Jan;42(1):42-49.
- 258) Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, Overdevest EP, van Zundert A, Knappe JT, Castelein RM, Creemers LB, Dhert WJ. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res* 2008 Mar;26(3):404-410.
- 259) Cieslik-Bielecka A, Gazdzik TS, Bielecki TM, Cieslik T. Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007 Mar;103(3):303-305.
- 260) Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, Orive G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat* 2013 Oct;195(5):461-466.
- 261) Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, Yazdi IK, Ferrari M, Simmons PJ, Tasciotti E. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials* 2012 Jul;33(21):5308-5316.

- 262)Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. PLoS One 2013 Jul 11;8(7):e68984.
- 263)Li H, Usas A, Poddar M, Chen CW, Thompson S, Ahani B, Cummins J, Lavasani M, Huard J. Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. PLoS One 2013 Jun 7;8(6):e64923.
- 264)Tavakolinejad S, Khosravi M, Mashkani B, Ebrahimzadeh Bideskan A, Sanjar Mossavi N, Parizadeh MR, Hamidi Alamdari D. The effect of human platelet-rich plasma on adipose-derived stem cell proliferation and osteogenic differentiation. Iran Biomed J 2014 Jul;18(3):151-157.
- 265)Loppini M, Longo UG, Niccoli G, Khan WS, Maffulli N, Denaro V. Histopathological scores for tissue-engineered, repaired and degenerated tendon: a systematic review of the literature. Curr Stem Cell Res Ther 2014;10(1):43-55.
- 266)Yokoya S, Mochizuki Y, Nagata Y, Deie M, Ochi M. Tendon-bone insertion repair and regeneration using polyglycolic acid sheet in the rabbit rotator cuff injury model. Am J Sports Med 2008; 36(7):1298-1309.
- 267)Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004 Apr;62(4):489-496.
- 268)Christie RJ, Carrington L, Alving B. Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombin: report of two cases. Surgery 1997 Jun;121(6):708-710.
- 269)Rapaport SI, Zivelin A, Minow RA, Hunter CS, Donnelly K. Clinical significance of antibodies to bovine and human thrombin and factor V after surgical use of bovine thrombin. Am J Clin Pathol 1992 Jan;97(1):84-91.

- 270)Zehnder JL, Leung LL. Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. *Blood* 1990 Nov;76(10):2011-2016.
- 271)Lenoir N. Europe confronts the embryonic stem cell research challenge. *Science* 2000 Feb 25;287(5457):1425-1427.
- 272)Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005 Apr 15;65(8):3035-3039.
- 273)Garcia S, Bernad A, Martin MC, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, de la Fuente R. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2010,May 15;316(9):1648-1650.
- 274)Tao H, Han Z, Han ZC, Li Z. Proangiogenic features of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1314709.
- 275)Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Büchler MW, Friess H, Büchler P, Herr I. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 2008 Aug 19;99(4):622-631.
- 276)Hildner F, Eder MJ, Hofer K, Aberl J, Redl H, van Griensven M3, Gabriel C, Peterbauer-Scherb A. Human platelet lysate successfully promotes proliferation and subsequent chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells: a comparison with articular chondrocytes. *J Tissue Eng Regen Med* 2015 Jul;9(7):808-818.
- 277)Chieriegato K, Castegnaro S, Madeo D, Astori G, Pegoraro M, Rodeghiero F. Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived

- growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. *Cytotherapy* 2011 Sep;13(8):933-943.
- 278)Castegnaro S, Chieriegato K, Maddalena M, Albiero E, Visco C, Madeo D, Pegoraro M, Rodeghiero F. Effect of platelet lysate on the functional and molecular characteristics of mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue. *Curr Stem Cell Res Ther* 2011 Jun;6(2):105-114.
- 279)Griffiths S, Baraniak PR, Copland IB, Nerem RM, McDevitt TC. Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy* 2013 Dec;15(12):1469-1483.
- 280)D'Esposito V, Passaretti F, Perruolo G, Ambrosio MR, Valentino R, Oriente F, Raciti GA, Nigro C, Miele C, Sammartino G, Beguinot F, Formisano P. Platelet-Rich plasma increases growth and motility of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and controls adipocyte secretory function. *J Cell Biochem* 2015 Oct;116(10):2408-2418.
- 281)Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC, Reinisch A, Horn P, Ho AD, Strunk D, Wagner W. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica* 2010 Jun;95(6):867-874.
- 282)Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, Dietz AB, Terzic A. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant* 2011;20(6):797-811.

- 283)Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, Jacobs CR. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods* 2009 Sep;15(3):431-435.
- 284)Xia W, Li H, Wang Z, Xu R, Fu Y, Zhang X, Ye X, Huang Y, Xiang AP, Yu W. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2011;35(6):639-643
- 285)Cervelli V, Scioli MG, Gentile P, Doldo E, Bonanno E, Spagnoli LG, Orlandi A. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance. *Stem Cells Transl Med* 2012;1(3):206-220.
- 286)Zhang J, Wang JH. Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. *Am J Sports Med* 2010 Dec;38(12):2477-2486.
- 287)Chen L, Dong SW, Liu JP, Tao X, Tang KL, Xu JZ. Synergy of tendon stem cells and platelet-rich plasma in tendon healing. *J Orthop Res* 2012 Jun;30(6):991-997.
- 288)Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012 Dec;65(12):1712-1719
- 289)Leijten J, Chai YC, Papantoniou I, Geris L, Schrooten J, Luyten FP. Cell based advanced therapeutic medicinal products for bone repair: keep it simple? *Adv Drug Deliv Rev* 2015 Apr;84:30–44.